

UBIRAJARA DUARTE DOS SANTOS

***EFEITOS ANSIOLÍTICOS DA BUSPIRONA EM RATOS COM
AVERSIVIDADE ADQUIRIDA AOS BRAÇOS ABERTOS DO
LABIRINTO EM "T" ELEVADO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis

1997

Duarte dos Santos, U. *Efeitos ansiolíticos da buspirona em ratos com aversividade adquirida aos braços abertos do labirinto em "T" elevado.*

Florianópolis, 1997. 91f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Defesa : 15.08.1997

[A buspirona] um derivado [azapirona] é usada clinicamente como droga [ansiolítica]. Entretanto, quando testada em animais, a buspirona tem efeitos variados, efeitos esses que variam da [ansiólise] à [ansiogênese]. O [labirinto em cruz elevado], o [modelo animal de ansiedade] mais utilizado, é o que apresenta os resultados mais variáveis para essa droga. A manipulação do animal antes do teste no [labirinto em cruz elevado] pode alterar o efeito dessa droga.

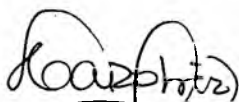
**“EFEITOS ANSIOLÍTICOS DA BUSPIRONA EM RATOS COM
AVERSIVIDADE ADQUIRIDA AOS BRAÇOS ABERTOS DO
LABIRINTO EM ‘T’ ELEVADO”**

POR

UBIRAJARA DUARTE DOS SANTOS

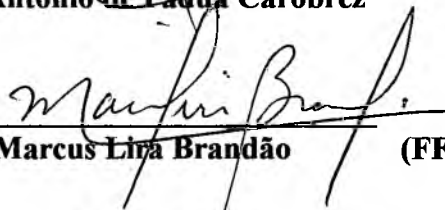
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da Banca
Examinadora, composta pelos Professores
Doutores:**

Banca Examinadora:



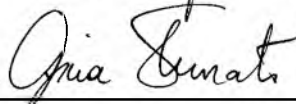
Antônio de Pádua Carobrez

(FMC/UFSC-Membro-titular)



Marcus Lima Brandão

(FFCLRP/USP)-Membro-Titular)



Gina Struffaldi Morato

(FMC/UFSC)-Membro Titular)



**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia**

Florianópolis, agosto de 1997.

Aos que vêm, e aos que vão

Esta tese é inteira dedicada a
Betina Bahr e a Waldir Antônio
dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela valorosa orientação, pelo incentivo constante ao ensino e pesquisa nesses anos de orientação e convívio.

Aos professores da Coordenadoria Especial em Farmacologia pela contribuição a minha formação científica.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia, especialmente ao Juarez, Josane, Sandra, Pedro e ao pessoal do biotério.

Aos professores Carlos Tomaz, Marcos Lira Brandão e Frederico Guilherme Graeff e funcionários dos respectivos laboratórios da Universidade de Filosofia Ciências e Letras da USP, pelo auxílio em uma das etapas experimentais desse estudo.

Aos colegas de curso, em especial a Márcia, Alvorita, José Geraldo, Orlando, Valdecir e aos demais pela colaboração.

Aos meus pais e parentes que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 - Serotonina	1
1.2 - Sistemas neuronais serotoninérgicos.	6
1.3 - Efeitos da microinjeção de serotonina no cérebro	11
1.4 - Função da serotonina na ansiedade	13
1.5 - Efeitos de drogas serotoninérgicas no Labirinto em Cruz Elevado	16
2 - Objetivos	20
3 - Materiais e métodos	21
3.1 - Animais	21
3.2 - Teste comportamental.	21
3.3 - Análise estatística	23
3.4 - Drogas e soluções	23
4 - Experimento 1	25
5 - Experimento 2	34
6 - Experimento 3	39
7 - Discussão	44
8 - Conclusões	58
RESUMO	59
ABSTRACT	62
9 - Referências Bibliográficas	64

1 - INTRODUÇÃO

De uma maneira geral, o comportamento é definido como um ajuste constante e dinâmico do organismo ao seu meio, baseado na regulação da atividade metabólica e no controle de sistemas eferentes. O comportamento é determinado pelo meio e mediado por mecanismos centrais que avaliam as informações e elaboram as respostas mais apropriadas (Bures e Huston, 1983).

Estas respostas, originam-se da operação de elementos neuronais adaptativos. A aquisição de respostas adaptativas específicas pode, em parte, ser compreendida como mudanças funcionais entre neurônios, os quais são modificados pela experiência. Os processos de plasticidade neuronal envolvem uma mudança nos transmissores químicos cerebrais, que podem ser divididos em duas classes principais: transmissores de baixo peso molecular, como as monoaminas ou aminas biogênicas, e, transmissores de alto peso molecular, como os neuropeptídeos (Ögren et al., 1985).

1.1 Serotonina

A serotonina (5-HT), uma indolalquilamina produzida endogenamente, pertence ao grupo das aminas biogênicas, junto com as catecolaminas: noradrenalina (NA) e dopamina (DA)

(Essman, 1978). O papel fisiológico da 5-HT foi mostrado nos estudos de Erspamer (1940) que descreveu os efeitos de uma substância vasoconstritora, "enteramina", extraída das células enterocromafins da mucosa gastrointestinal de coelho. Em 1949, Rapport isolou uma substância do sangue que poderia causar vasoconstrição, a estrutura molecular da mesma foi subsequentemente identificada como 5-hidroxitriptamina. Em 1952, Erspamer e Asero também identificaram a enteramina, uma substância ativa em extratos biológicos, como 5-hidroxitriptamina ou serotonina. A serotonina foi sintetizada quimicamente por Hamlin e Fischer em 1951 e, posteriormente, detectada no sistema nervoso central (SNC) de rato por Twarog e Page em 1953.

Nas últimas décadas, tem-se visto que o papel da serotonina no SNC é variado, incluindo a regulação de processos como atividade respiratória e cardiovascular, sono, agressão e comportamento sexual, ingestão de nutrientes, ansiedade, humor, eferências motoras, secreções neuroendócrinas, nocicepção e analgesia (Jacobs e Fornal, 1991).

A consideração de que a serotonina poderia ser um neurotransmissor central, envolvido na modulação de comportamentos emocionais, surgiu principalmente com a observação da atividade de antagonistas 5-HT em paradigmas de conflito operante (Robichaud e Sledge, 1969), bem como,

associação da redução da atividade serotoninérgica e os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (Goldberg et al. 1967).

Um dos comportamentos emocionais no qual a serotonina está envolvida é a ansiedade. A ansiedade é essencial para uma adaptação biológica normal. Ela ocorre como uma reação ao estresse, mas requer um ou mais substratos biológicos através dos quais ela é mediada. Há, entretanto, fatores ambientais e constitucionais envolvidos na sua etiologia, cuja contribuição varia individualmente. Às vezes a ansiedade é referida como 'traço de ansiedade', ansiedade que ocorre em sujeitos devido a constituição da sua personalidade. Diferente de 'estado de ansiedade', que ocorre como uma manifestação de uma reação psicogênica ao estresse, de menor duração (Edwards, 1991).

Existe a hipótese de que o excesso da amina biogênica 5-hidroxitriptamina (5-HT), serotonina, aumenta a ansiedade, enquanto que a redução da atividade serotoninérgica a diminui. Esta hipótese teve início com a descoberta de que a *para-clorofenilalanina* (PCPA) (Geller e Blum, 1970), inibidora da síntese de 5-HT, e dois antagonistas de receptor 5-HT, metisergida e ácido bromolisérgico, liberam comportamento suprimido por punição (Graeff e Schoenfeld, 1970). Graeff e Schoenfeld (1970) observaram que o efeito anticonflito da metisergida em pombos, era comparável aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos e sugeriram a existência

de um mecanismo triptaminérgico, no cérebro, envolvido na inibição do comportamento. Logo depois, Stein et al.(1973) relataram que o oxazepam reduzia a atividade da 5-HT no cérebro de rato na mesma dose que extinguia o comportamento punido. Estes pesquisadores, sugeriram que uma redução em um sistema que suprimia a punição comportamental, mediaría a ação ansiolítica dos benzodiazepínicos. Desde essas descobertas, o conhecimento sobre a origem e distribuição dos sistemas neuronais 5-HT, e os tipos e subtipos de receptores 5-HT, tem sido obtidos (Graeff, 1993b).

As ações da serotonina são mediadas pela interação específica desta amina com vários receptores. Estudos farmacológicos, fisiológicos e estudos de biologia molecular revelaram uma heterogeneidade entre os receptores 5-HT. Saudou e Hen (1994) classificaram os receptores 5-HT de acordo com os perfis farmacológicos dos receptores, seus acoplamentos com segundos mensageiros e também sua sequência de aminoácidos.

Os receptores 5-HT conhecidos são: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ e 5-HT₇.

Através de estudos da distribuição regional de RNAs mensageiros e de sítios de ligantes radioativos desses receptores, observou-se a distribuição dos receptores 5-HT

no sistema nervoso central (Saudou e Hen, 1994), representada no quadro abaixo:

Receptores	Mecanismo de transdução	Localização
5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}	Acoplados negativamete a adenilato ciclase	hipocampo (CA1-CA3-Giro Denteado), núcleos da rafe, amígdala e septo. estriado, células ganglionares da retina, núcleos subtalâmicos, córtex entorrinal e cíngulo, células de Purkinje do cerebelo, núcleos da rafe, substância nigra, globo pálido e colículo superior, núcleo acumbens, no caudado e putâmen, córtex parietal.
5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}	estimulam a fosfolipase C.	córtex cerebral, estriado, bulbo olfatório, na ponte, hipocampo (CA1-CA3) e hipotálamo
5-HT ₃	canais iônicos disparados por ligantes	córtex cerebral, hipocampo, amígdala e bulbo olfatório.
5-HT ₄ , 5-HT ₆ e 5-HT ₇	que estimulam a adenilato ciclase	estriado, globo pálido, substância nigra, tubérculo olfatório e hipocampo, núcleo acumbens, córtex cerebral, hipotálamo, tálamo, complexo amigdalóide, colículo superior e núcleos da rafe dorsal e paramediano
5-HT _{5A} , 5-HT _{5B}	acoplados a proteína G	hipocampo (CA1-CA3-Giro Denteado), córtex cerebral, camada granular do cerebelo, bulbo olfatório, habenula e núcleo dorsal da rafe.

1.2 - Sistemas Neurais Serotonérgicos.

O controle que a serotonina exerce sobre os sistemas aversivos, ocorre através de vias neurais específicas. Os neurônios 5-HT tem origem nos núcleos da rafe, que ocupam a linha média do mesencéfalo e medula. Os núcleos mais rostrais da rafe, como o dorsal e o mediano, parecem ter um envolvimento maior com o controle da aversão que os núcleos mais caudais, como os núcleos magno e obscuro da rafe (Handley, 1995).

O núcleo dorsal da rafe inerva o septo lateral e o hipocampo ventral, o que parece ser a origem dos sinais de segurança. Além disso, o núcleo dorsal da rafe inerva quase que completamente a amígdala, uma estrutura chave do Sistema de Defesa (Handley, 1995).

O Sistema de Defesa é considerado como a conduta diante de ameaças impostas externamente, tal como predação (Fanselow, 1991). Em um nível superior, a amígdala recebe projeções do córtex ou do tálamo de acordo com a complexidade do estímulo. A amígdala pode exercer controle sobre níveis inferiores, tais como a "área de defesa" hipotalâmica que lhe fornece acesso a reações endócrinas e cardiovasculares apropriadas. A amígdala também possui fibras eferentes para a substância cinzenta periaquedutal (SCP), uma das regiões do

sistema de defesa mais importantes do cérebro (Graeff et al., 1988; Fanselow, 1991).

A SCP é constituída por uma aglomeração de neurônios pequenos e médios que formam uma estrutura densa, circundando o aqueduto de Sylvius (Gerrits et al., 1993). Rostralmente ela é contínua com a região periventricular adjacente ao terceiro ventrículo. Na parte caudal ela se comunica intimamente com a matéria cinzenta que circunda o quarto ventrículo. Ventralmente limita-se com núcleos relacionados com o supraoculomotor (núcleos troclear, de Edinger-Westphal, de Darkschewitsch e o intersticial de Cajal) e dorsalmente com as camadas que compõem o teto mesencefálico (Bandler et al., 1991).

Vários esquemas têm sido propostos para dividir a SCP em subnúcleos baseados nas suas características citoarquitetônicas. Prichard e Beitz (1980) sugerem que a SCP pode ser subdividida em quatro áreas: 1) medial: composta de pequenos neurônios bipolares, que circundam firmemente o aqueduto; 2) ventrolateral: que contém predominantemente neurônios fusiformes e neurônios multipolares grandes, além de neurônios bipolares pequenos, orientados em um ângulo de 100 - 150° em relação ao aqueduto; 3) dorso-lateral: composta predominantemente de células de forma triangular, pequenos neurônios bipolares e multipolares, orientados em um ângulo de 30 - 70° em relação

ao aqueduto e; 4) dorsal: constituída por pequenos neurônios bipolares e multipolares sem orientação preferencial.

Carrive (1993) e Bandler et al. (1991) propuseram uma nova organização para a SCP, baseada na citoarquitetura funcional, utilizando-se de respostas neurovegetativas e comportamentais evocadas pela administração local de aminoácidos excitatórios (AAE). Segundo esses autores, a SCP pode ser subdividida de forma radial em cinco regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventromedial, cada uma delas formando uma coluna longitudinal.

Atualmente, essa é a subdivisão mais aceita, pois se baseia em estudos que sugerem que a SCP não é uma estrutura cerebral funcionalmente homogênea (Bandler, 1991).

A SCP recebe eferências de centros superiores como o córtex, sistema límbico e sistema motor extrapiramidal, além disso, a SCP tem acesso direto a informação visual via colículo superior, e essa informação está disponível para associar o contexto e iminência do perigo com a escolha da resposta defensiva. Sensores da pele, baroreceptores e quimiorreceptores também fornecem a SCP informação crucial para defesa (Fanselow, 1991).

A SCP dorsal é importante nos comportamentos motores explosivos, tais como, corrida "cega" e pulos, fuga e agressão defensiva, em conjunto com estimulação

cardiovascular e respiratória e analgesia não opióide (Handley, 1995). Há uma considerável semelhança entre a estimulação da SCP dorsal humana e o ataque de pânico (Graeff, 1991). A estimulação desta área, em humanos, produz sensações de medo intenso e morte iminente (Nashold et al., 1969).

As funções da SCP ventrolateral são mais controversas. A ativação desta área parece estar associada com a supressão comportamental, imobilidade e congelamento. Fanselow (1991) propôs um papel na defesa passiva, e realmente, as mudanças autonômicas que acompanham a estimulação desta área se assemelham àsquelas do estresse (Bohus et al., 1990), enquanto Lovik (1991, 1993a,b) sugeriu um papel recuperativo após estresse ou exaustão física. Esses dois papéis não são compatíveis, visto que, a estimulação da porção caudal, em humanos, provoca sensações agradáveis, enquanto que a estimulação da porção rostral desta área provoca sensações desagradáveis (Young, 1989).

O núcleo mediano da rafe tem projeções ao hipocampo dorsal e ao septo medial, regiões que parecem ser responsáveis pelas origens do Sistema de Inibição Comportamental (Gray, 1982).

A existência de um Sistema de Inibição Comportamental foi proposto por Gray em 1982 (1982, 1991). Esse sistema

teria como função suprimir o comportamento onde houvesse a ocorrência de punição ou de não recompensa.

O conflito resultante entre a aproximação e a esquivia foi visto como fundamental para a ansiedade, visto que o comportamento 'suprimido' é liberado pelos benzodiazepínicos. É possível que o Sistema de Inibição Comportamental opere quando houver uma escolha a ser feita referente a um comportamento recompensado.

As vias eferentes do Sistema de Inibição Comportamental propostas são principalmente através do subiculum e habenula e, alcançam o Sistema de Defesa no hipotálamo e na SCP, e vias aferentes via o núcleo accumbens (Gray, 1991). Lesões no septo medial mostram efeitos liberadores e respostas associadas com o Sistema de Inibição Comportamental em paradigmas que envolvem conflito de aproximação e esquivia (Yamashita, et al., 1989; Treit e Pesold, 1990; Yadin et al., 1993).

Segundo Geyer et al. (1976), Parent et al. (1981) e Steinbusch and Nieuwenhuys (1983), há uma projeção do núcleo mediano da rafe inervando a região basolateral da amígdala. Os núcleos dorsal e mediano da rafe inervam o córtex, com predominância de aferências do núcleo dorsal da rafe ao córtex frontal e hipotálamo. Os gânglios da base são outras estruturas cerebrais que recebem aferências, predominantemente, do núcleo dorsal da rafe, embora haja

evidências de que o núcleo mediano da rafe também inerve esta região. Os núcleos dorsal e mediano da rafe também têm projeções para a SCP dorsal e o colículo superior, enquanto que a SCP ventrolateral é inervada pelo núcleo dorsal da rafe. Os núcleos bulbares da rafe possuem projeções para a SCP dorsal e ventrolateral (Beitz et al. 1986). Foi identificada uma aferência predominantemente inibitória, partindo do núcleo obscuro da rafe até a SCP dorsal, a qual parece inervar receptores 5-HT_{1A} e em menor quantidade receptores 5-HT₂ (Lovick, 1993a,b).

Os núcleos da rafe dorsal e mediano estão interconectados e também têm conexões com os núcleos rubro e obscuro da rafe. A principal aferência límbica ocorre através da habenula lateral por uma via excitatória (de aminoácido excitatório) que inerva os núcleos da rafe mediano e dorsal e também terminam nos interneurônios GABAérgicos que circundam estes núcleos. O hipotálamo também tem aferências aos núcleos dorsal e mediano da rafe (Handley, 1995).

Todos esses sistemas devem funcionar de um modo integrado no controle do comportamento motivado aversivamente, há sinais de uma hierarquia rostro-caudal (Redgrave & Dean, 1991).

1.3 - Efeitos da Microinjeção de Serotonina no Cérebro

A microinjeção intracerebral de compostos agonistas ou antagonistas da serotonina, tem mostrado diferentes efeitos que dependem da região do cérebro onde essas drogas são aplicadas.

A injeção bilateral intrahipocampal de 5-HT prolongou o tempo de retenção do reflexo da esquiva passiva, inibindo o restabelecimento do reflexo de esquiva ativa e facilitando sua extinção (Gasnov *et al.*, 1986).

A microinjeção de 5-HT ou o bloqueio dos receptores pré-sinápticos da SCP dorsal, que causa um aumento no nível de 5-HT, aumenta o limiar da resposta aversiva produzida pela estimulação da SCP dorsal (Nogueira & Graeff, 1991). Estes resultados demonstram que um aumento dos níveis de 5-HT na SCP dorsal é anti-aversivo. Jenck *et al.* (1990) também investigaram o papel da serotonina e de alguns receptores 5-HT na SCP dorsal. Foram encontrados efeitos anti-aversivos de agonistas com potente atividade sobre o receptor 5-HT_{1c} como a *m*-Trifluoro-metilfenilpiperazina (TFMPP), 1-(3-clorofenil)-piperazina (mCPP) e (+)-1-(1,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano (DOI), efeitos estes, revertidos pelo pré-tratamento com mianserina, antagonista do receptor 5-HT_{1c}. Esses dados demonstraram a existência de um papel importante dos receptores 5-HT_{1c} no controle serotoninérgico da aversão na SCP.

Melo e Brandão (1994), observaram que a microinjeção de zimelidina, um bloqueador da captação de 5-HT, de 8-hidroxi-dipropilaminotetralin 8-OH-DPAT, um agonista clássico do receptor 5-HT_{1A}, e de α -metil-5-hidroxitriptamina, um potente agonista do receptor 5-HT₂, no colículo inferior têm efeitos anti-aversivos claros de um modo dependente da dose.

A microinjeção de 8-OH-DPAT, agonista do receptor 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe, produz efeito ansiolítico em ratos testados no labirinto em cruz elevado. Este efeito é antagonizado pelo tertatolol, antagonista do receptor 5-HT_{1A} (File & Gonzales, 1996).

Os experimentos com microinjeção intracerebral de compostos com atividade sobre os receptores 5-HT, demonstram um efeito contrário a hipótese de que o excesso de serotonina aumenta a ansiedade, e a diminuição da atividade da mesma, é ansiolítica.

1.4 -Função da Serotonina na Ansiedade

A secreção de hormônios em resposta a agonistas 5-HT diretos e indiretos tem sido examinada em sujeitos controle e em pacientes com distúrbios de ansiedade e humor (Eriksson and Humble, 1990; Murphy *et al.*, 1991).

A 1-(3-clorofenil) piperazina mCPP causa aumento da ansiedade em voluntários normais, bem como, em pacientes com

distúrbios de ansiedade, incluindo distúrbio do pânico (DP) e distúrbio obsessivo compulsivo (DOC) (Murphy et al., 1991). "Ataques de pânico" tem sido descritos em sujeitos controle e sujeitos com DP, mas, a semelhança entre o ataque de pânico desses sujeitos com ataque de pânico espontâneo e o ataque de pânico induzido por CO₂, é questionada.

A ansiedade induzida por mCPP é descrita como persistente e aparece em fase enquanto que, ataques de pânico naturais, ou induzidos por CO₂, ocorrem com um aumento de intensidade. Surpreendentemente, quando dado em doses aumentadas gradualmente durante um período de duas semanas, o mCPP teve um efeito terapêutico fraco ao invés de efeito ansiogênico, em pacientes psiquiátricos com início de reação de ansiedade após descontinuação (Mellow et al., 1988).

Pacientes com DP experimentam uma exacerbação muito maior dos sintomas da ansiedade após o uso do mCPP (Murphy et al., 1991) ou fenfluramina (Targum and Marshall, 1989) que controles normais.

Tem havido um interesse considerável no envolvimento do controle respiratório no DP. Acredita-se que estes pacientes possam ter um alarme de sufocamento desordenado, que quando ativado, deflagra o terror e tentativas de fuga (Coplan et al., 1992). A serotonina está envolvida no controle da respiração, e a depleção de 5-HT causa hiperventilação; o

mCPP pode induzir depressão respiratória, incluindo apnéia (Eriksson e Humble, 1990).

A ipsapirona também tem sido alvo de estudos. Ela não causa aumento da ansiedade nos pacientes controle, que relataram sentir sonolência e inatividade. Efeitos semelhantes foram vistos com a buspirona e com a gepirona. Pacientes com DP, classificaram-se como menos calmos e, alguns, experimentaram sintomas do tipo pânico. Os sintomas não foram alterados em pacientes com distúrbios obsessivo compulsivos (DOC). A infusão de 5-hidroxitriptofano, em contraste, resultou em pacientes com DP sensações de relaxamento e diminuição da ansiedade, enquanto que sujeitos controle relataram irritabilidade (Westernberg e Dan Boer, 1989). O uso da ipsapirona em pacientes com DP, causou uma hipotermia menor que em sujeitos controle, isto foi sugerido como indicador de subsensibilização dos autoreceptores 5-HT_{1A} dos corpos celulares. Estes pacientes também experimentaram respostas hormonais cortisol/adrenocorticotrópico, sugerindo a possibilidade da subsensibilização dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos em áreas que controlam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Estas mudanças na sensibilidade do receptor 5-HT_{1A} poderiam refletir alterações nos mecanismos glicocorticóides. Em contraste, o teste com a ipsapirona não revelou diferenças nos pacientes com DOC, embora a atenuação da hipotermia e secreção de hormônio

adrenocorticotrópico/cortisol em pacientes deprimidos podem ser relevantes no distúrbio de ansiedade generalizada (Lesch, 1992).

Baixos níveis de 5-HIAA no fluido cerebrospinal (FCE) são frequentemente associados com um aumento da ansiedade e/ou uma baixa no limiar de tolerância da ansiedade (Rydin *et al.*, 1982). Além disso, níveis reduzidos de 5-HIAA no FCE, tem sido relatados em distúrbios marcados por diminuição do controle do impulso e/ou agressividade, incluindo tentativas de suicídios por meios violentos, assassinatos impulsivos e violentos, incêndios culposos, alcoolismo, distúrbios alimentares, síndrome pré-menstrual e outras formas de impulsividade (Eriksson e Humble, 1990).

Há uma evidência crescente que tais distúrbios impulsivos respondem a inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Há uma ocorrência excessiva de distúrbios de ansiedade em pacientes com distúrbios de impulsividade (McElroy *et al.*, 1982).

1.5 - Efeitos de drogas serotoninérgicas no Labirinto em Cruz Elevado

A ansiedade é uma emoção que não pode ser medida em animais. Modelos animais que detectam a ansiedade medem uma resposta adaptativa apropriada a um estímulo ameaçador à

segurança ou bem estar, estas respostas tem valor de sobrevivência.

Existem mais de trinta paradigmas de comportamento animal declarados como modelos de ansiedade. A maioria deles envolvidos com exposição de animais a estímulos externos ou internos que, supostamente, são capazes de induzir ansiedade em humanos. A classe dos estímulos externos pode ser agrupada em duas subclasses: a primeira subclasse inclui modelos baseados etologicamente e envolve reação natural ou espontânea a um estímulo de estresse que não envolva explicitamente dor ou desconforto. A segunda subclasse, envolve respostas condicionadas dos animais a eventos estressantes e frequentemente dolorosos.

A hipótese de que um excesso de serotonina no cérebro provoca ansiedade ou, que a redução da atividade da mesma provoca uma diminuição da ansiedade, surgida com os experimentos Geller e Blum em 1970 e Graeff e Schoenfeld também em 1970, provocou uma procura por drogas ansiolíticas, clinicamente úteis, com atividade neste sistema neurotransmissor.

Nas últimas décadas, tem-se estudado exaustivamente os efeitos de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores 5-HT em muitos modelos animais (Handley, 1995). Em alguns modelos, as drogas que antagonizam um receptor 5-HT, ou reduzem o disparo neuronal serotoninérgico, apresentam um

efeito ansiolítico. No entanto, este efeito, frequentemente, não é tão robusto ou seguro quanto os efeitos dos benzodiazepínicos (Lister, 1990). Há também, testes onde as drogas que antagonizam a serotonina, ou diminuem o disparo neuronal da mesma, têm efeitos variáveis ou ansiogênicos (Green, 1991).

O 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor da serotonina, mostrou efeitos bifásicos no teste de conflito de Vogel (Hjorth et al., 1987), enquanto que um agonista do receptor 5-HT_{1B}, RU24969, suprimiu a resposta neste modelo.

Antagonistas com alta afinidade pelo receptor 5-HT_{2c} e 5-HT₃, reduzem a aversão nos modelos de conflito de Geller e Vogel, enquanto que antagonistas com alta afinidade pelo receptor 5-HT_{2A}, não tiveram o mesmo efeito (Kennett, 1992, 1993; Stefanski et al., 1992).

A (mCPP) é um agonista serotoninérgico misto, com pequena seletividade pelos receptores 5-HT_{2c} (Kennett, 1993). A mCPP causa supressão de resposta, no teste de interação social, em um "teste de livre exploração" e diminui a exploração no LCE (Griebel et al., 1991; Handley e Mc Blane, 1993).

A redução da aversão ao aumento da intensidade da luz é um dos efeitos mais consistentes dos agonistas parciais dos receptores 5-HT_{1A} e dos antagonistas do receptor 5-HT₃. Estes efeitos são vistos no teste da caixa claro-escuro (Jones et

al., 1988) e no teste de interação social, com a intensidade de luz aumentada (Stefanski et al., 1992).

A maior variabilidade dos efeitos dos agentes serotonérgicos ocorre no teste do LCE. Alguns experimentos demonstram que agonistas dos receptores 5-HT₂, agonistas parciais 5-HT_{1A}, antagonistas 5-HT₂ e antagonistas 5-HT₃, podem, tanto aumentar, como diminuir a exploração nos braços abertos do LCE (Critchley e Handley, 1987; Pellow et al., 1987).

Respostas comportamentais associadas ao choque como congelamento e vocalização ultrasônica, são reduzidas por agonistas parciais dos receptores 5-HT_{1A} (Sanger, 1990).

A esquiva ativa de uma, ou de duas vias é diminuída pelo tratamento agudo de agonistas do receptor 5-HT_{1A}, o mesmo não acontece quando o tratamento é de longa duração (Evenden, 1992).

O LCE é sensível a manipulação da SCP dorsal (Audi et al., 1989; Nogueira e Graeff, 1991). Há evidências de que agonistas parciais 5-HT_{1A} podem reduzir, pós-sinapticamente, o comportamento motor explosivo induzido por estimulação da SCP dorsal (Handley, 1995).

2 - Objetivos.

Baseado nos fatos relatados nesta introdução, que apontam para um efeito de compostos serotonérgicos dependentes de um estado basal de ansiedade, nos propusemos a investigar a ação de um composto agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, a buspirona, no modelo animal de ansiedade, o labirinto em cruz elevado, em animais submetidos previamente as seguintes manipulações aversivas:

- a) Microinjeção de glicina na SCP dorsal.
- b) Confinamento nos braços abertos do LCE.
- c) Aquisição de esquiva inibitória no labirinto em T-elevado.

3 - Materiais e Métodos Gerais

3.1 - Animais

Foram utilizados 255 ratos "hooded", com peso entre 290 e 320g . Os animais foram alojados, na quantidade máxima de seis animais, em caixas plásticas (15 x 36 x 30 cm), com forração de serragem. Estes animais permaneceram nas caixas até completarem 4 meses de idade. Durante o período de permanência nas caixas, água e comida foram oferecidas livremente.

3.2 - Teste comportamental

O teste comportamental utilizado foi o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse modelo foi desenvolvido, a partir do trabalho de Montgomery (1958), por Handley e Mithani em 1984. Posteriormente, Pellow et al. (1985) executaram a validação comportamental, fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

Esse aparato, em forma de cruz, consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) opostos, e dois braços fechados por parede (50 x 10 x 40 cm), também opostos. O aparelho estava elevado 50 cm do chão. Os braços abertos foram circundados por um anteparo de acrílico com 1 cm de altura, para evitar a

queda dos animais. Uma arena quadrada (60 x 60 x 35 cm), confeccionada em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, com o objetivo de habituar o animal à luminosidade da sala (Lister, 1987a).

O aparelho usado no experimento estava em uma sala com iluminação indireta, com intensidade de 44 Lux. Após cada teste, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 10%.

Durante o teste do LCE foram registrados os seguintes comportamentos:

- a) frequência de entrada dos animais nos braços abertos (FEA) e nos fechados (FEF);
- b) o tempo de permanência dos animais nos braços abertos (TPA) e fechados (TPF);
- c) a frequência de tentativas de entradas nos braços abertos (FT). Foi considerada tentativa o ato do animal colocar a cabeça e uma, duas ou três patas em um dos braços abertos, seguido de retorno ao centro ou a um dos braços fechados do LCE;
- d) a frequência de levantar ("rearing") (FL). Esse comportamento é caracterizado pela postura do animal quando ele se coloca em posição vertical, com o corpo apoiado nas patas traseiras em extensão.
- e) frequência de auto-limpeza (FAL) ("grooming"). Embora seja caracterizado por uma sequência de comportamentos, foi

considerado apenas a auto-limpeza executada na região da face.

3.3 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M.. Quando foram detectadas diferenças de variâncias pelo teste de Bartlett, os dados foram transformados até que houvesse homogeneidade de variâncias. As comparações entre os tratamentos e o controle foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste pos hoc utilizado foi LSD. A rejeição da hipótese de nulidade foi admitida para efeitos com probabilidades menor que 5% ($p < 0,05$). Em adição, para a interação entre variáveis independentes, foi fixado o valor de $p < 0,1$, para efeito de análise pos hoc.

3.4 - Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas: buspirona (RBI, EUA) dissolvida em solução de salina 0,9%, solução de equitesin composta de hidrato de cloral (8,5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,252 g), água destilada (91,4 ml), pentobarbital sódico (1,94 g), álcool etílico (13,0 ml) e propilenoglicol (85,6 ml). Foram usados ainda, 0,1 ml/animal de pentabiótico veterinário (Abbott, Brasil) pela via intramuscular. O volume

injetado de Buspirona foi de 1 ml/kg. O equitesin foi injetado num volume de 0,3 ml/100g.

Para injeções intracerebrais foram utilizados os seguintes compostos: líquido, constituído por NaCl (8,1 g), KCl (0,25 g), CaCl₂ (0,14 g), MgCl₂ (0,11 g) e Na₂CO₃ (1,0 g), dissolvidos em um litro de água destilada (Merlis, 1940); glicina (Sigma, EUA), dissolvida em líquido. Os volumes utilizados para as injeções intracerebrais foram de 0,4 µl/sítio neural.

4 - Experimento 1 - Ação da buspirona no labirinto em cruz elevado em ratos microinjetados com glicina na SCP dorsal.

A introdução da técnica de estereotaxia, a partir da década de 30, associado a metodologia de estimulação elétrica, permitiu o estudo mais detalhado de estruturas subcorticais, dentre elas a substância cinzenta periaqueductal (SCP). Em 1939, Rason e Magoun, com o objetivo de mapear o hipotálamo de gatos anestesiados, mostraram que respostas mediadas pelo sistema nervoso simpático eram produzidas quando determinadas regiões cerebrais recebiam estimulação elétrica.

Krieger e Graeff (1985) demonstraram que microinjeções de baixas doses (5 nmol) de glutamato, um aminoácido excitatório agonista do complexo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA_R), na SCP dorsal, induziam respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa.

O complexo receptor ionóforo NMDA possui vários sítios de ligação. Um desses sítios é o sítio regulatório para a glicina, conceituada como "co-agonista" do neurotransmissor glutamato (Kleckner e Dingledine, 1988).

Em modelos animais de ansiedade, a glicina que atua em um sítio receptor acoplado ao receptor NMDA, microinjetados na SCP dorsal, têm mostrado ação ansiogênica (Schmitt et al., 1995).

Visto que há evidências de que os agonistas parciais 5-HT_{1A} são capazes de reduzir um dos comportamentos da reação de defesa induzida por estimulação da SCP dorsal (Handley, 1995), propusemo-nos verificar se o efeito da buspirona, um agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, pode alterar a reação de defesa provocada pela microinjeção de glicina na SCP dorsal.

4.1 - Materiais e Métodos

Cirurgia estereotóxica

Os animais foram anestesiados com Equitesin (0,3 ml/100g, IP); uma vez verificada a perda total dos reflexos, foram tricotomizados na parte superior da cabeça, e posteriormente, foram fixados ao aparelho estereotático (Stoelting, mod. 300, USA).

Após esta etapa, realizou-se a assepsia da área tricotomizada com álcool iodado, e, uma injeção de xilocaína com adrenalina (2%) foi injetada subcutaneamente por todo campo cirúrgico. Procedeu-se a exposição da calota craniana numa área desde 3 a 4 mm posterior a sutura lambdóide até 3 a 4 mm anteriores a sutura coronária através da remoção cirúrgica de uma área ovalada. O perióstio de toda região foi raspado. Em seguida, o crânio foi posicionado no aparelho

estereotático de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi seco e a calota perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Um dos parafusos foi colocado no centro do osso parietal esquerdo e o outro no osso parietal direito. Foram utilizadas cânulas de 13 mm confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis (25 x 7 mm). As cânulas foram implantadas, direcionadas a SCPD, obedecendo as seguintes coordenadas estereotáticas: ML = 1,9 mm; DV= 2,0 mm em ângulo de 22°, na intersecção da sutura lambdóide.

Estando parafusos e cânula adaptados, a área aberta foi preenchida com uma prótese de acrílico autopolimerizável que, ao endurecer, agregou todas as peças em uma prótese sólida. Um mandril foi adaptado a cânula guia, com o objetivo de prevenir a sua obstrução.

Ao término da cirurgia, cada animal recebia 0,1 ml de pentabiótico veterinário, por via intramuscular, sendo em seguida colocado em uma caixa, dotada de lâmpada de 40 W para aquecimento, até seu despertar. Posteriormente, os animais foram removidos para uma caixa individual, onde receberam água e comida livremente, e ali permaneceram por sete dias até serem utilizados.

Microinjeção intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,4 mm de comprimento (0,3 mm de diâmetro), adaptadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas a microseringas (Hamilton, 10 μ l), por um tubo de polietileno. As agulhas possuíam 3,4 mm de comprimento a mais que a cânula-guia para possibilitar que as drogas fossem microinjetadas na SCPD. As seringas foram preenchidas com água destilada e com a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado e, em seguida, foi retirado o mandril adaptado a cânula durante a cirurgia estereotáxica. Com o auxílio de limas odontológicas, a cânula-guia foi desobstruída. Posteriormente, a agulha foi suavemente introduzida através da cânula-guia e, cada animal foi injetado na SCPD com 0,4 μ l da solução controle ou droga. O tempo gasto para a execução das microinjeções variou de 90 a 120 segundos. Ao final de cada microinjeção, a agulha foi deixada no local por 30 segundos adicionais.

Protocolo experimental

No dia do teste, cada animal era colocado em uma antecâmara com iluminação de 720 lux. Nesse local era feita a microinjeção com líquido artificial (LA) ou glicina (GLI), 5 minutos após, o mesmo animal era injetado por via

Intraperitoneal (IP) buspirona nas doses 0,25; 2,5; 5,0 mg/kg ou salina. Após 20 minutos, o animal era transportado para a sala do LCE e colocado na arena de madeira. Passados 5 minutos, o animal era transferido para o centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e seu comportamento registrado por um período de 5 minutos.

Histologia

Ao término de cada teste comportamental, os animais foram anestesiados com solução de Equitesin (0,3 ml/100 g, IP). Os cérebros foram perfundidos por via intracardiaca com solução de salina (NaCl, 0,9%), seguida por solução de formaldeído (10%) por cerca de 3 minutos. Posteriormente, os cérebros receberam uma microinjeção de azul de Evans (0,4 µl).

Seguiu-se a decaptação e a remoção dos respectivos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído (10%). Os cérebros foram fatiados em micrótomo de congelamento (Cryocut 1800, USA). Os sítios das injeções foram indentificados através da comparação dos cortes com os diagramas do atlas do cérebro de ratos de Swanson (1992). Estes sítios se encontram ilustrados na figura 1.

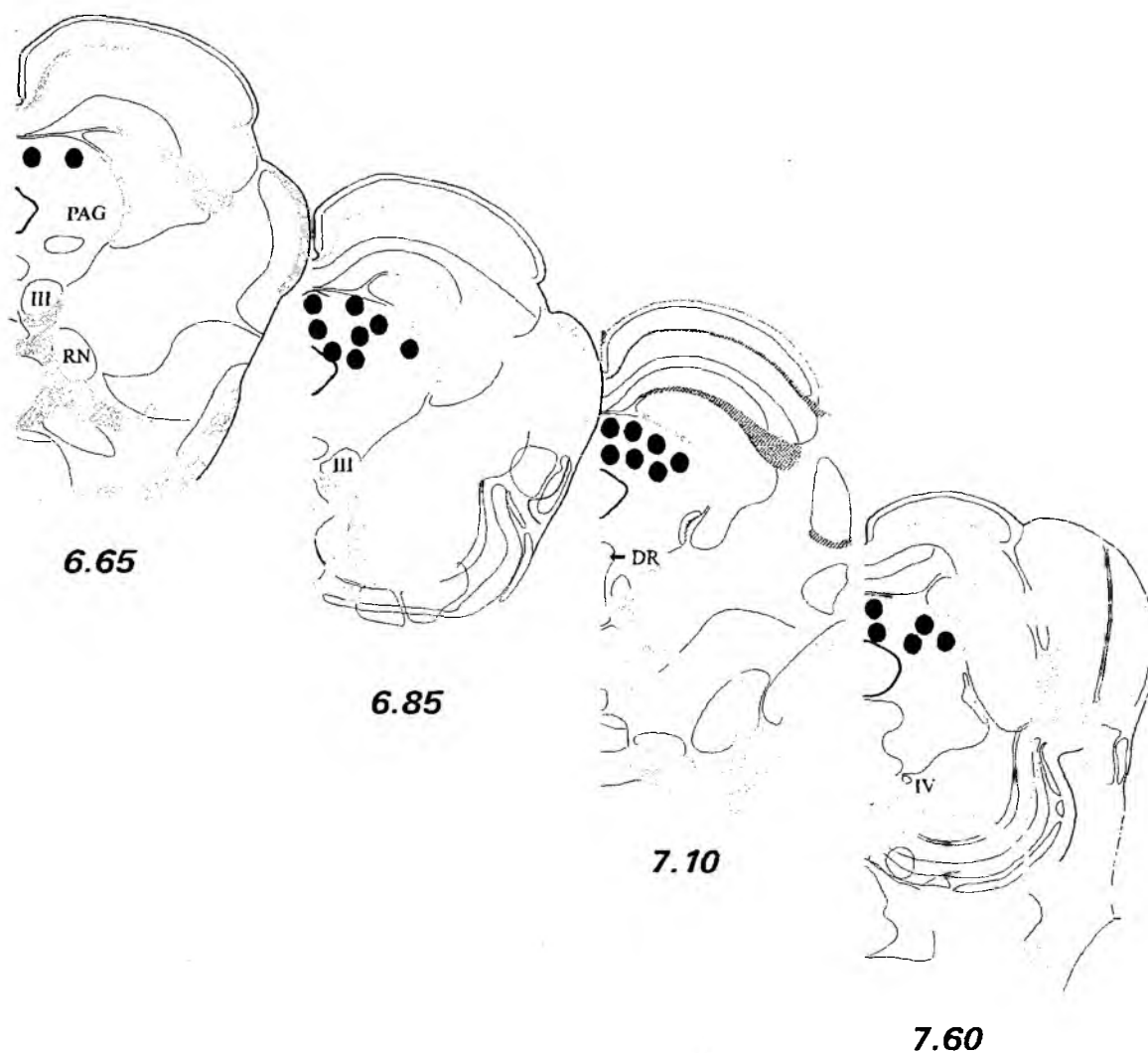


FIGURA 1 - Secções frontais do atlas de Swanson (1992), indicando os sítios de microinjeções de compostos na SCP dorsal. O número de círculos é menor que o número de animais utilizados devido a sobreposição de sítios. Os valores representam as distâncias em mm a partir do bregma.

4.2 - Resultados

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 2 e 3.

A ANOVA detectou um efeito da interação entre as injeções intracerebral e intraperitoneal para FEA [$F(3,69)=2,64$; $p<0,056$] e TPA [$F(3,69)=2,42$; $p<0,07$]. O teste pos hoc mostrou que a buspirona, na dose de 0,25 mg/kg, promoveu um aumento ($p<0,05$) na FEA. Este efeito foi abolido em ratos tratados com glicina (Fig. 2). Embora a figura 2 mostre haver uma tendência a um aumento na FEA em animais microinjetados com glicina, após o tratamento com buspirona na dose de 2,5 mg/kg, a análise da figura 3 mostra que este tratamento reduziu a FEF [$F(3,79)=2,98$; $p=0,036$] e a FL [$F(3,79)=4,02$; $p=0,01$], parâmetros de atividade geral.

A buspirona, na dose de 5,0 mg/kg, reduziu a FL [$F(3,79)=18,62$; $p=0,001$] em ratos tratados ou não, com glicina, que apresentaram ainda um aumento na FEF. Observou-se ainda, um aumento na FEF [$F(3,79)=10,47$; $p=0,001$] em ratos microinjetados com glicina após o tratamento com buspirona 0,25 mg/kg.

Não foram detectadas quaisquer efeitos significativos da buspirona, com microinjeções de líquido ou glicina, nos parâmetros FT e FAL (Fig. 3B e D).

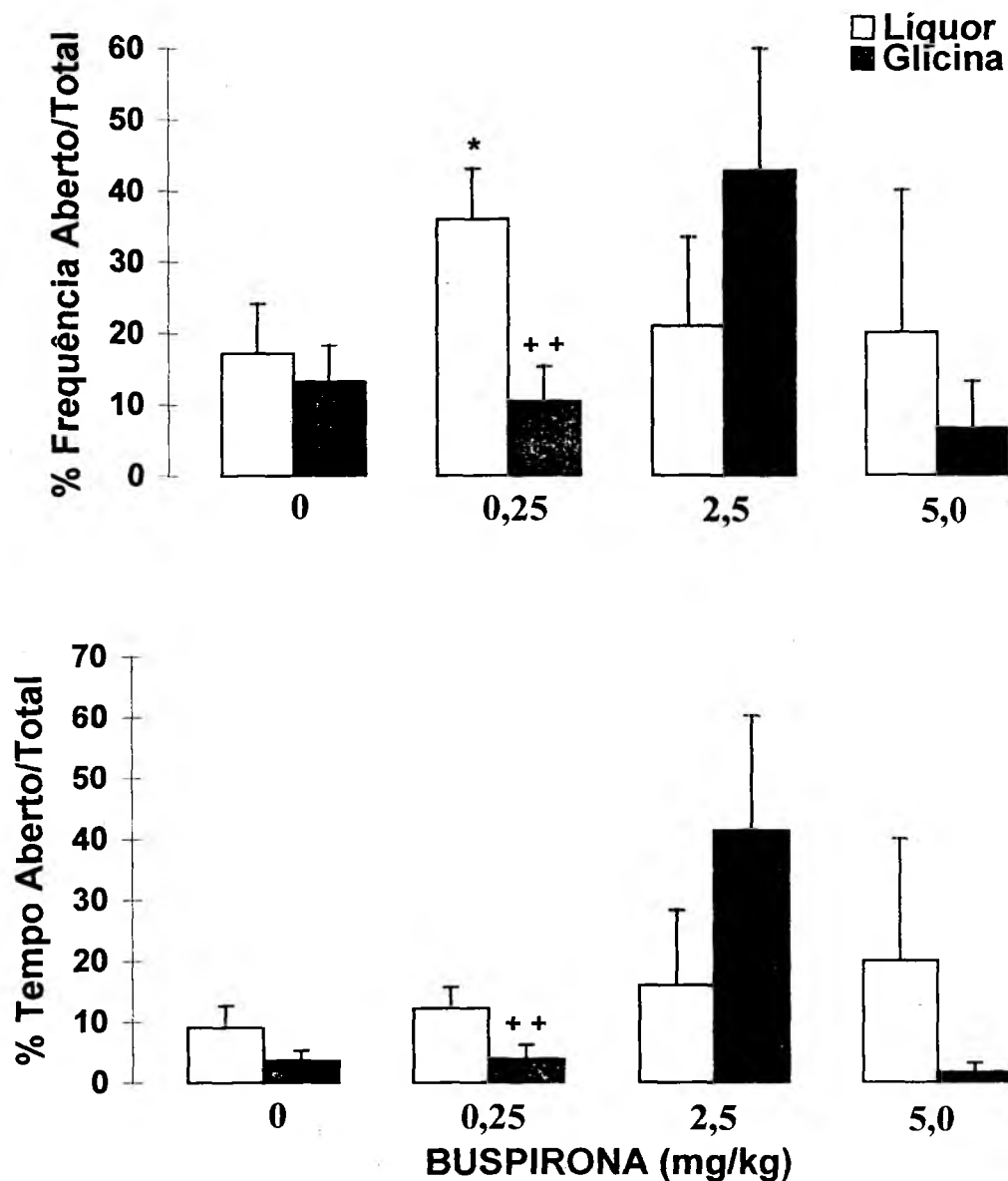


FIGURA 2 - Efeitos da bupiriona nos parâmetros porcentagem de frequência de entradas (painel superior) e porcentagem do tempo de permanência (painel inferior) nos braços abertos, em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado, previamente microinjetados com líquido (0,4 μ l; barras claras) ou glicina (80nmol; 0,4 μ l; barras escuras). Cada valor representa a média \pm E.P.M. * = $p < 0,05$, comparando-se com o grupo bupiriona 0 mg/kg, e ++ = $p < 0,001$, comparando-se com o grupo líquido (N = 8-14) .

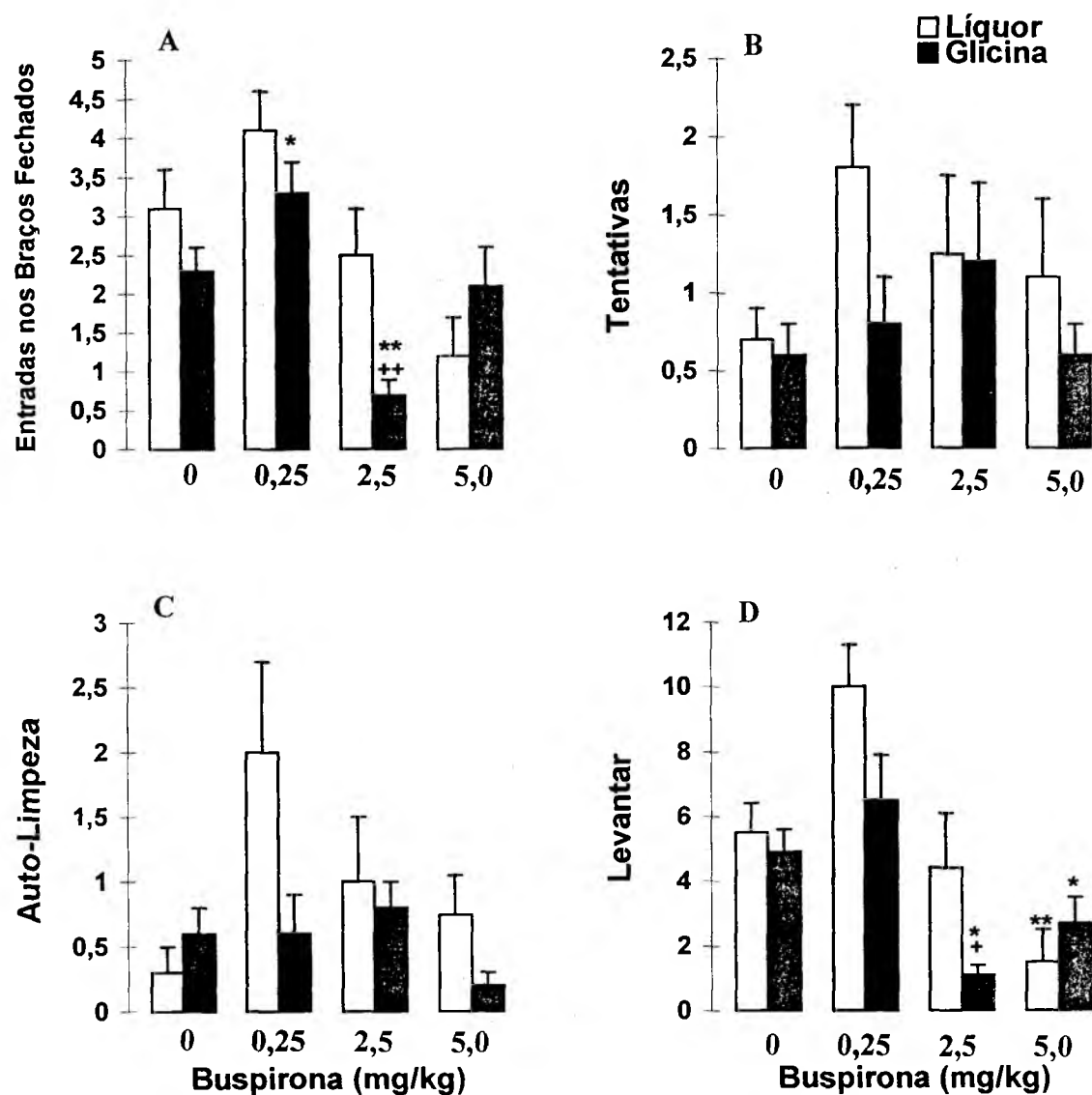


FIGURA 3: Efeitos da bupiriona nos parâmetros de comportamento de atividade geral, em ratos micronjetados com líquido (0,4 μ l; barras claras) ou glicina (80 nmol; 0,4 μ l; barras escuras) na SCP dorsal submetidos ao LCE. Cada valor representa a média \pm E.M.P. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, comparando-se com o grupo bupiriona 0 mg/kg, e + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$, comparando-se com o grupo líquido (N = 8-14).

5 - Experimento 2 - Ação da buspirona no labirinto em cruz elevado, após o confinamento nos braços abertos por 20 minutos.

Nos experimentos de validação comportamental, Pellow et al. (1985) investigaram a influência de raças, período do dia, condições de alojamento e efeitos da ausência de luz no comportamento exploratório de ratos no LCE, e, concluíram que esses fatores não interferiam no comportamento do animal.

Falter et al. (1992), utilizando-se de fatores que poderiam aumentar ou diminuir o nível de estresse basal tais como intensidade de luz, altura e configuração do LCE, imersão parcial na água, imobilização forçada, eletrochoque e exposição prévia aos braços abertos ou fechados, verificaram que nenhum desses fatores foi capaz de alterar a linha de base da FEA e do TPA em animais controle.

Em uma segunda abordagem, para estudar o efeito de manipulações de procedimentos, foi proposto uma avaliação dos efeitos da buspirona em animais testados no LCE após isolamento nos braços abertos do LCE por 20 minutos, 24 horas ou imediatamente antes do teste.

5.1 - Materiais e Métodos

Protocolo experimental

Os ratos foram separados em número de cinco por caixa, 24 horas antes da pré-exposição ao braço aberto do LCE, com água e comida oferecidos livremente.

No dia do experimento, os animais foram alojados individualmente em caixas plásticas e colocados durante 20 minutos em um dos braços abertos do LCE, este mesmo isolado com um pedaço de madeira preenchendo a abertura que permite ao animal o acesso aos outros braços do LCE.

Parte dos animais foram testados imediatamente após o isolamento, a outra parte voltou a ser agrupada em caixas de cinco animais e testada no dia seguinte.

Para o teste comportamental, os animais seguiram o mesmo protocolo do experimento 1.

5.2 - Resultados

A ANOVA realizada com os dados obtidos detectou efeito entre as injeções intraperitoneais para a FEF [$F(3,72) = 12,1$; $p < 0,0001$] FT [$F(3,72) = 5,32$; $p = 0,0023$], FAL [$F(3,72) = 4,99$; $p = 0,0034$] e FL [$F(3,72) = 18,34$; $p = 0,0001$], (Fig. 5). Nos ratos isolados nos braços abertos 24 horas antes do teste, a

buspirona, na dose de 5,0 mg/kg, provocou uma redução ($p<0,05$) nos parâmetros de comportamento de atividade geral, FEF, FT, FAL e FL, enquanto que a dose de 2,5 mg/kg reduziu ($p<0,05$) a FT, a FAL e a FL (Fig. 5).

Nos ratos isolados imediatamente antes do teste, a buspirona, na dose 5,0 mg/kg, provocou uma redução ($p<0,05$) na FEF, na FT e na FL, enquanto que a dose de 2,5 mg/kg provocou uma diminuição ($p<0,05$) na FEF e na FL (Fig. 5).

A FAL dos ratos isolados imediatamente antes do teste foi menor [$F(3,72)=4,38$; $p<0,0069$] que a FAL dos ratos isolados 24 horas antes do teste. Este efeito da condição foi revertido ($p<0,05$) após o tratamento com buspirona na dose de 0,25 mg/kg (Fig. 5C).

O isolamento nos braços abertos não alterou a porcentagem de frequência e o tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 4).

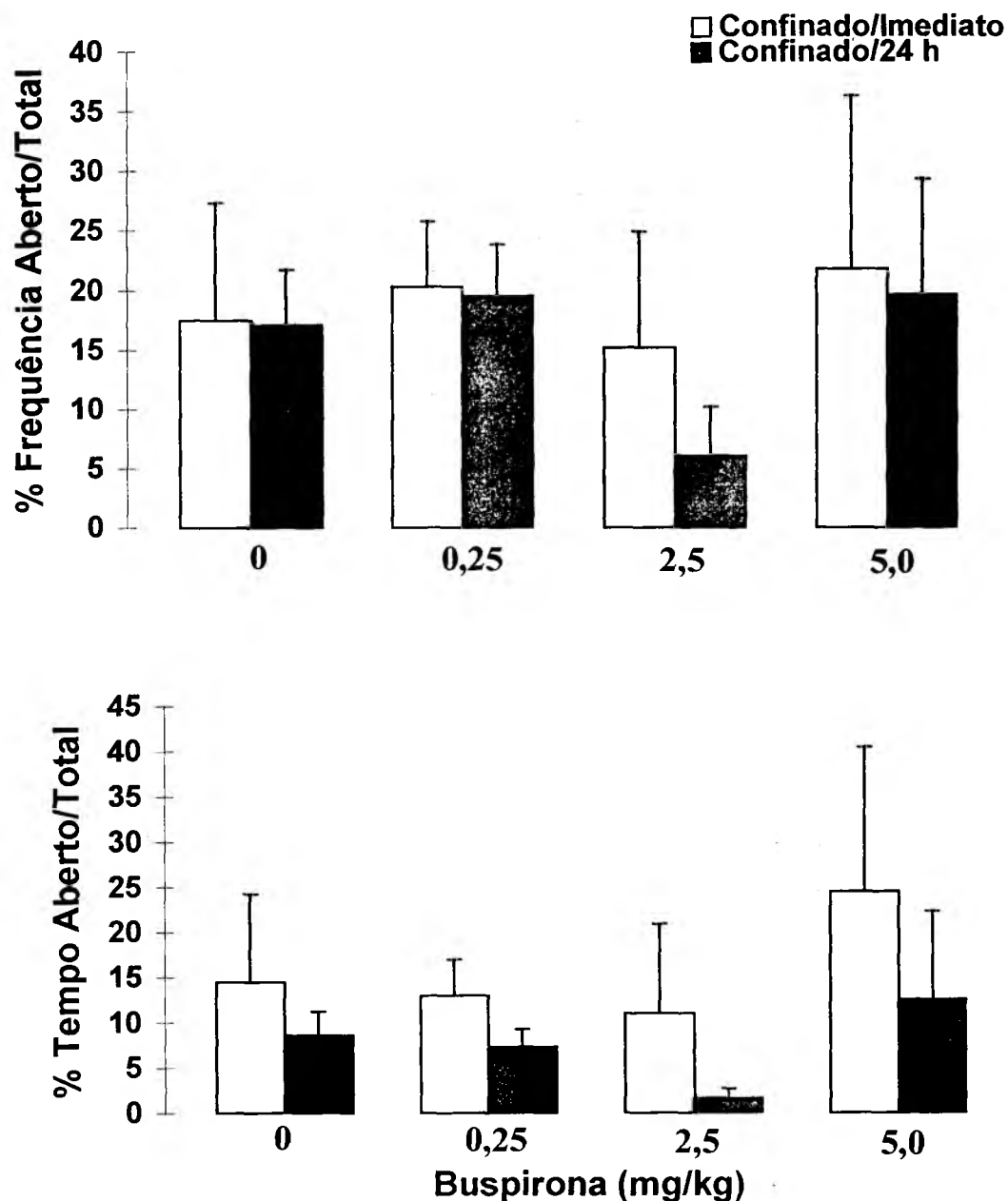


Figura 4: Efeitos das doses crescentes de buspirona na porcentagem de entradas (painel superior) e na porcentagem do tempo de permanência (painel inferior) nos braços abertos, em ratos previamente confinados nos braços abertos do LCE imediatamente (barras claras), ou LCE 24 horas (barras escuras) antes do teste no LCE (N = 10).

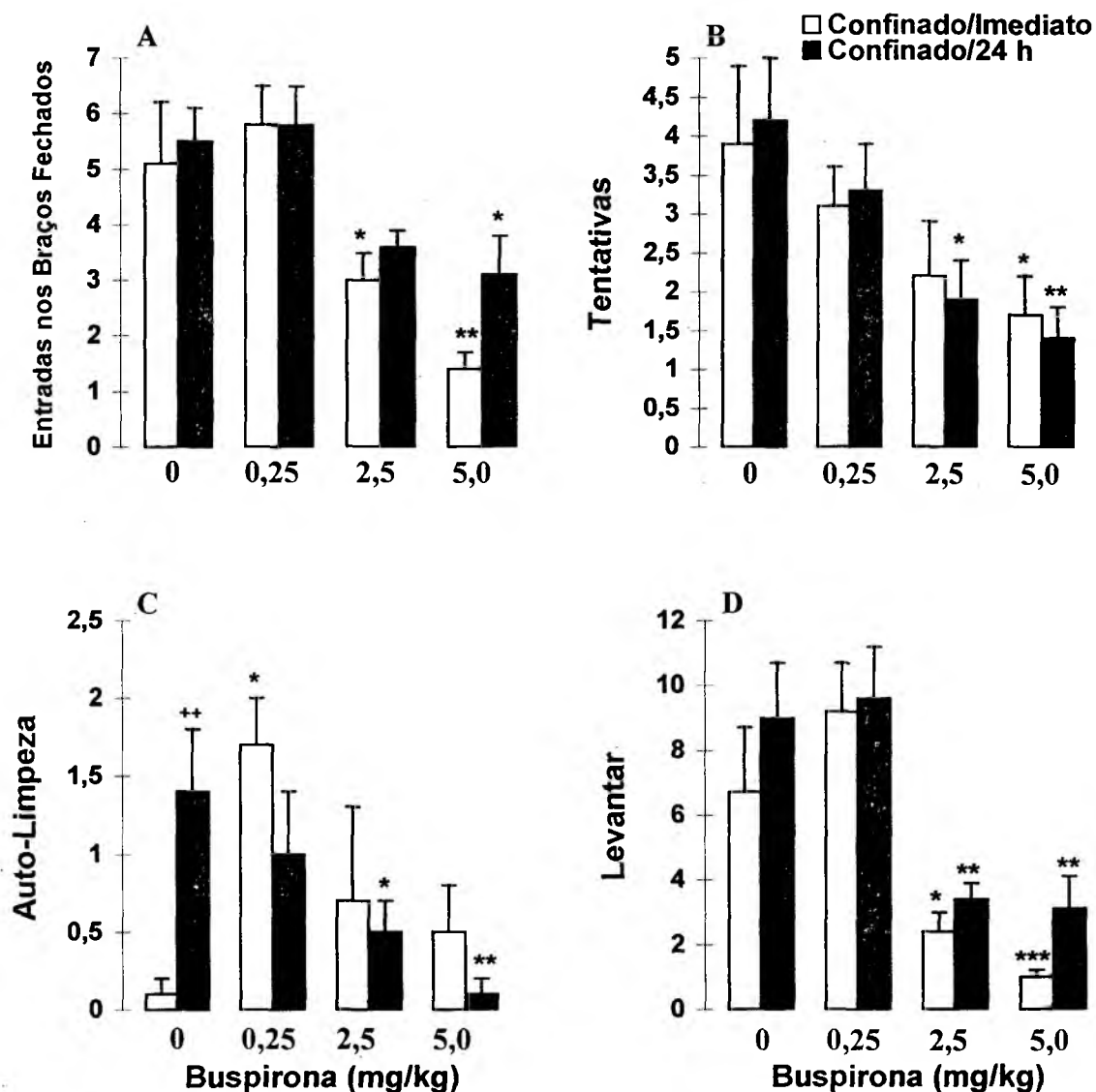


FIGURA 5: Efeitos da bupiriona nos parâmetros de comportamento de atividade geral, em ratos isolados nos braços abertos, imediatamente antes (barras claras), ou 24 horas antes (barras escuras) do teste no LCE. Cada valor representa a média \pm E.M.P. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,005$, comparando-se com o grupo bupiriona 0 mg/kg, e ++ = $p < 0,01$, comparando-se com os ratos isolados nos braços abertos imediatamente antes do teste (N = 10).

6 - Experimento 3 - Ação da buspirona no labirinto em cruz elevado, após aquisição de esquiva inibitória no labirinto em T-elevado.

Em 1994, Viana, Tomaz e Graeff introduziram o labirinto em T elevado, um novo modelo animal de ansiedade e memória, visto que, modelos animais de ansiedade, nem sempre avaliam fatores cognitivos.

No teste do labirinto em T elevado, há uma parte do experimento que avalia a esquiva inibitória. A esquiva inibitória é uma tarefa muito usada para estudar os mecanismos de memória (Bures, Buresova e Huston, 1983), e, há um grande número de evidências experimentais que indicam uma sobreposição das estruturas cerebrais envolvidas com a ansiedade e com a modulação da memória (Tomaz et al., 1992).

Os resultados dos testes no labirinto em T elevado demonstram que, em animais controle, há uma aquisição de esquiva inibitória, que é verificada quando o animal é testado novamente no labirinto em T elevado 72 horas (Viana et al., 1994), ou até 3 meses (Sanson e Carobrez, comunicação pessoal), após a primeira exposição.

Baseados nos relatos citados acima, nos propusemos a investigar o efeito da buspirona em ratos testados no LCE, uma semana após a aquisição de esquiva inibitória no teste do labirinto em T elevado.

6.1 Materiais e Métodos

Protocolo experimental

Os animais foram submetidos ao labirinto em T elevado até a aquisição da esquiva inibitória, representada pela permanência do rato no lado fechado por 5 minutos.

No dia da exposição ao labirinto em T elevado, os animais foram levados, individualmente, em caixas plásticas para a sala do LCE, com iluminação de 40 lux. O animal era transferido para o fim do braço fechado do labirinto em T elevado, e o tempo ,máximo de 5 minutos, para que o animal saísse do braço fechado com as quatro patas era marcado. Este procedimento foi repetido até se atingir o critério de permanência do rato no braço fechado por 5 minutos.

Uma semana após a aquisição da esquiva inibitória no labirinto em T elevado os animais foram submetidos ao LCE conforme procedimento geral descrito em 2.

6.2 - Resultados

Nas figuras 6 e 7 estão representados os resultados do experimento 3.

A ANOVA feita com os os dados obtidos neste experimento, mostrou que a buspirona não alterou os parâmetros FEA e TPA

dos animais controle, contudo, a buspirona alterou esses parâmetros FEA [$F(3,76)=3,16$; $p=0,0293$] e TPA [$F(3,76)=2,80$; $p=0,045$], em ratos testados após a aquisição da esQUIVA inibitória.

O teste pos hoc mostrou que, nos animais que adquiriram a esQUIVA inibitória, houve uma redução na FEA [$F(1,76)=4,15$; $p=0,045$] e na TPA [$F(1,76)=4,09$; $p=0,046$]. Este efeito foi abolido ($p<0,05$) pela buspirona nas doses de 0,25 e 2,5 mg/kg (Fig. 6).

A ANOVA detectou ainda, um efeito da buspirona para os parâmetros FEF [$F(1,80)=8,7$; $p=0,004$], FT [$F(1,80)=8,58$; $p=0,004$], FL [$F(3,80)=8,17$; $p=0,0001$] e FAL [$F(1,80)=9,81$; $p=0,002$].

O teste pos hoc mostrou que a buspirona, na dose de 5,0 mg/kg, reduziu ($p<0,05$) os parâmetros FEF, FT e FL (Fig. 7A, B e C). A mesma dose de buspirona também reduziu ($p<0,05$) a FEF e a FL em ratos controle (Fig. 7A e C).

A exposição prévia ao labirinto em T elevado provocou um aumento ($p<0,05$) nos parâmetros FT e FAL (Fig. 7B e C).

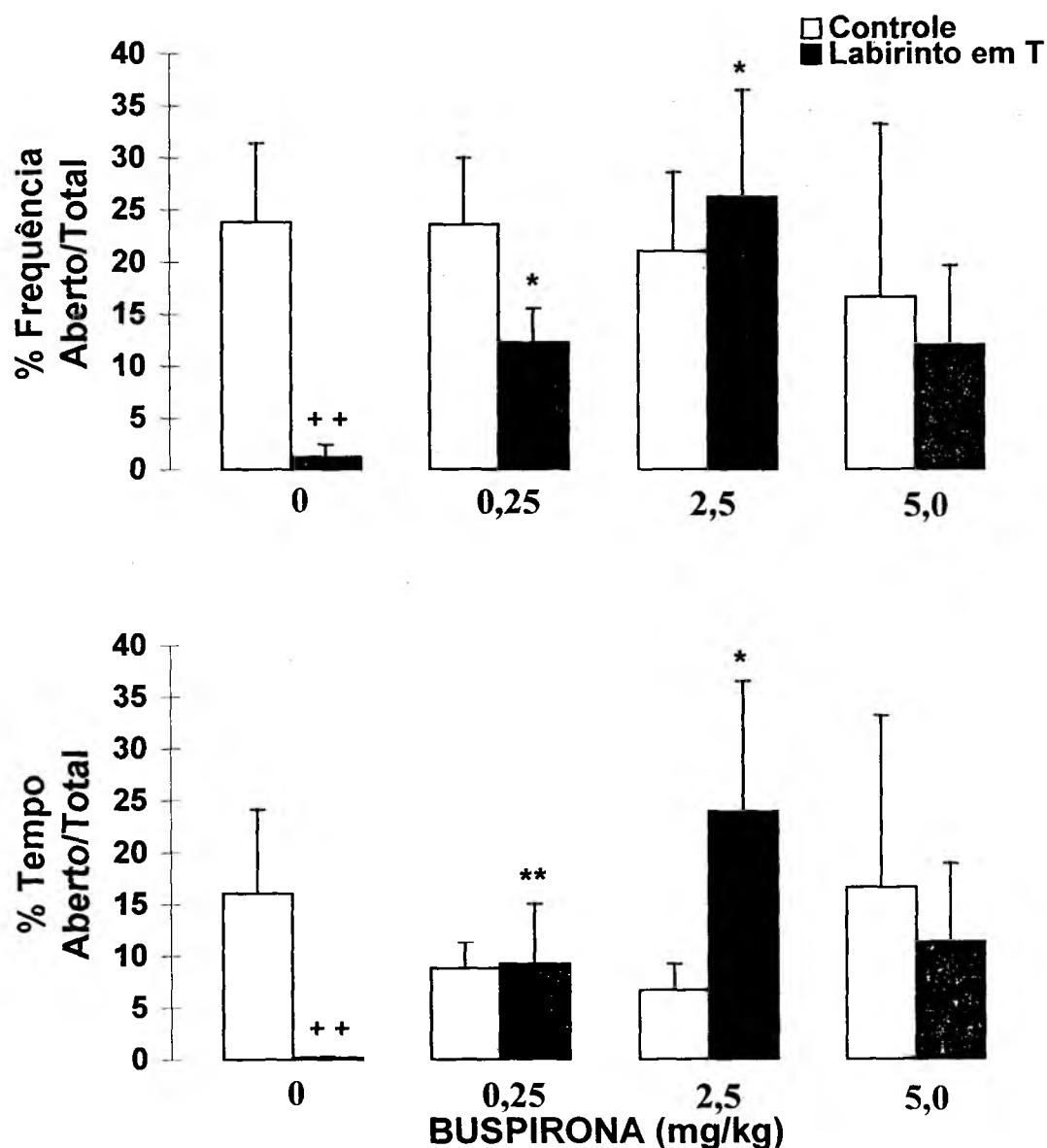


Figura 6: Efeitos da buspirona nos parâmetros porcentagem de frequência de entradas (painel superior) e porcentagem do tempo de permanência (painel inferior) nos braços abertos, em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado, em animais controle (barras claras), ou após a aquisição da esquia inibitória (barras escuras). Cada valor representa a média \pm E.M.P. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, comparando-se com o grupo buspirona 0 mg/kg, e ++ = $p < 0,01$, comparando-se com os animais controle (N = 8-15)

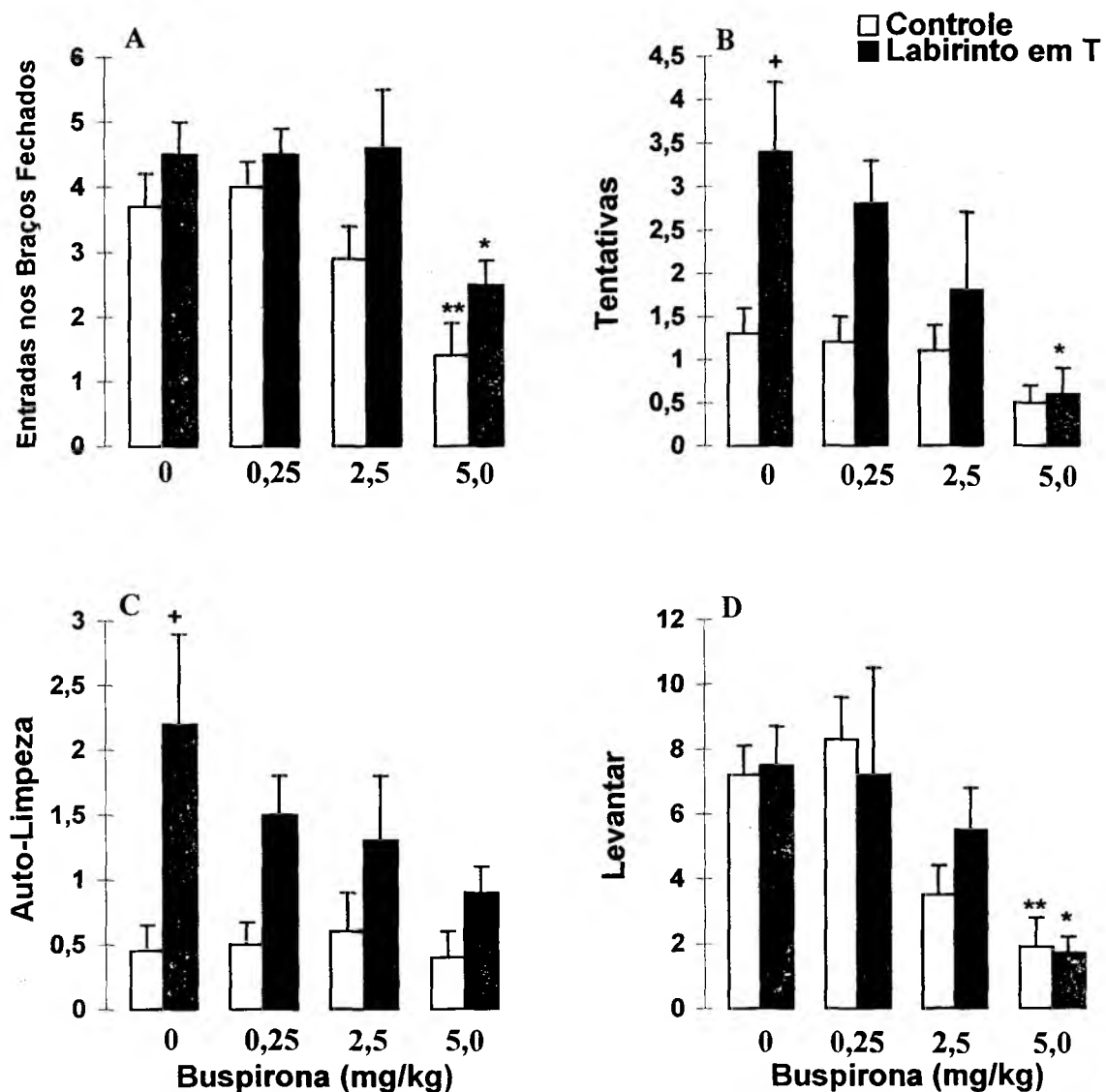


Figura 7: Efeitos da buspirona nos parâmetros de comportamento de atividade geral, em ratos controle (barras claras) e ratos que adquiriram esQUIVA INIBITÓRIA (barras escuras). Cada valor representa a média \pm E.M.P. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ comparados com o grupo buspirona 0 mg/kg, e ; + = $p < 0,05$, comparados com os animais controle (N = 8-15).

7 - Discussão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível detectar que, o efeito da buspirona no labirinto em cruz elevado, varia de acordo com as manipulações de procedimento aplicadas.

Em resumo, as evidências obtidas foram as seguintes:

a) A buspirona apresenta efeitos inconsistentes em animais previamente microinjetados com glicina na SCP dorsal.

b) A buspirona, na dose de 5,0 mg/kg, reduziu as medidas de atividade geral, porém não interferiu com os parâmetros FEA e TPA, nos animais previamente confinados no lado aberto do LCE por 20 minutos.

c) A aquisição da esquiva inibitória no labirinto em T elevado (LTE) mostrou ser uma situação aversiva, reduzindo a FEA e o TPA. A buspirona, nas doses 0,25 e 2,5 mg/kg, produziu um efeito ansiolítico em ratos que adquiriram esquiva inibitória no labirinto em T elevado.

O LCE usado em nossos experimentos foi baseado nas descrições feitas por Handley e Mithani (1984) e Pellow et al. (1985). O que se tem mostrado, é que as drogas ansiogênicas diminuem a percentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, dentro de uma faixa de doses que não afeta a atividade geral ou o total de entradas nos

braços fechados (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986), como índice de atividade geral.

Com o passar do tempo, desde a validação do LCE, outros comportamentos evocados pelos animais durante os testes foram incluídos para análise. Assim, Rodgers e Cole (1993) adotaram como medidas de atividade geral no LCE, a FL, a FAL e a FEA. Lopes da Silva (1994), Lopes de Souza e Carobrez (1992) introduziram no seu protocolo experimental a FT como parâmetro comportamental de atividade geral. Esse parâmetro é caracterizado pelo número de vezes que o animal, estando em um dos braços fechados ou no centro do LCE, tenta explorar os braços abertos. A análise fatorial mostrou, contudo, que esse comportamento estaria mais relacionado com a atividade de exploração geral, do que com a ansiosseletividade. Em nossos experimentos, esses parâmetros comportamentais, associados com os parâmetros denominados "clássicos" (Rodgers e Cole, 1993), foram analisados em relação a cada tratamento e condição utilizados.

A auto-limpeza ("grooming") se trata, na realidade, de um grupo de respostas somáticas, autonômicas e endócrinas, associadas com comportamentos adaptativos, os quais asseguram a sobrevivência do animal (Celis e Torre, 1993). Em roedores, o comportamento de auto-limpeza segue uma espécie de hierarquia. Inicia-se mais comumente com a limpeza do nariz pelas patas dianteiras, que previamente são levadas a boca

para serem umedecidas. Seguem-se atos de lambidas pelo corpo, até alcançar a região que envolve o ânus e a genitália.

O comportamento de auto-limpeza é um bom recurso para avaliar os efeitos de vários peptídeos, posto que muitos deles, como as adrenocorticotropinas, hormônios estimulantes dos α -melanócitos (ACTH/ μ -MSH) (Gispen e Isaacson, 1981; Dunn e Hurt, 1986), endorfinas e bombesinas (Crawley e Moody, 1983) podem induzir comportamento de auto-limpeza excessivo, tornando-se assim um modo conveniente para estudar a estrutura cerebral na qual o peptídeo atua e quais neurotransmissores estão envolvidos no comportamento.

O comportamento de auto-limpeza pode ser provocado com a estimulação elétrica ou química de determinadas áreas do SNC (Spruijt et al., 1986; Van Erp et al., 1993). O núcleo paraventricular e a área hipotalâmica dorsal (Roeling et al., 1991) têm sido apontadas como regiões que desencadeiam esse comportamento. Roeling et al. (1993) consideram o hipotálamo como uma "área de auto-limpeza" específica. Outras áreas cerebrais como o septo, os núcleos amigdalóides e a SCP, quando estimulados, podem provocar esse comportamento, uma vez que possuem vias aferentes e eferentes com o hipotálamo (Van Erp et al., 1993). A auto-limpeza está relacionada de uma forma muito direta com o estresse, mais precisamente àquele desencadeado por situações novas e conflitantes. Ratos colocados em ambientes estranhos, têm o número de auto-

limpezas aumentado (Dunn et al., 1981). A significância biológica desse comportamento ainda não está claramente identificada, mas tentamos fazer um elo entre esse comportamento, o modelo animal de ansiedade utilizado neste trabalho, e a estimulação química da SCP dorsal. O LCE é um ambiente estranho e aversivo para os animais; a SCP dorsal, por sua vez, já foi apontada como a região cerebral desencadeadora (Sprujt et al., 1986) do comportamento de auto-limpeza, e tem sido demonstrado que drogas ansiolíticas podem diminuir a frequência desse comportamento (Crawley e Moody, 1983).

A frequência de levantar ("rearing") é um comportamento de atividade geral mais relacionado com a exploração de ambientes novos. Drogas estimulantes promovem um aumento desse comportamento, enquanto drogas depressoras o deprimem (Shillito, 1970). No que tange ao fator ansiedade, a frequência de levantar tem sido avaliada em testes animais, sendo que, o argumento que justifica seu uso é de que o aumento de uma atividade locomotora refletiria em uma diminuição do estado de ansiedade experimentado pelo animal (Lister, 1990). Os agonistas parciais dos receptores 5-HT_{1A} aumentam a locomoção de animais em ambientes não familiares (Kilfoil et al., 1989; Young e Johnson, 1991a,b; Barnes, et al., 1992). Entretanto, drogas estimulantes motoras aumentam a frequência de levantar sem, no entanto, terem atividade

ansiolítica (Cunha e Mansur, 1978). Portanto, o comportamento de levantar, quando analisado em um teste comportamental de ansiedade como o LCE, tem que ser relacionado a outros parâmetros comportamentais, de forma que a interpretação dos resultados não incorra em erros (Juraska et al., 1984).

A estimulação química da SCP se constitui de outro modelo animal utilizado para investigar a participação de sistemas neurotransmissores nas respostas do organismo à ansiedade (Graeff, 1987, 1990, 1991, 1993b; Graeff et al., 1988), alguns componentes da reação de defesa (Bandler, 1988; Fanselow, 1991) e nocicepção (Reynolds, 1969; Behbehani e Fields, 1979).

Por ser uma estrutura integrativa, recebendo projeções de várias áreas do sistema nervoso central, que compreendem a amígdala (Rizvi et al., 1991; Graeff et al., 1993), hipotálamo medial (Olds e Olds, 1963; Lu et al., 1992), hipocampo (Kim et al., 1993), núcleos da rafe, (Beitz e Williams, 1991) e colículo inferior (Brandão et al., 1993), o interesse sobre essa estrutura tem crescido nos últimos anos.

Vários trabalhos apontam para diversos sistemas neuronais presentes na SCP, notadamente na parte dorsal, tendo sido sugerido que mecanismos GABAérgicos exercem uma inibição tônica sobre a organização de respostas aversivas nessa região (Brandão et al., 1982; Schmitt et al., 1995), enquanto que outros experimentos têm mostrado a presença do

sistema serotoninérgico na SCP dorsal, inibindo as respostas aversivas de forma fásica (Schutz et al., 1985 e Audi et al., 1991). Além disso, encontramos evidências da participação do sistema opióide (Jenck, et al., 1986; Brandão, 1993), do sistema peptidérgico (Da-Silva et al., 1989) e também tendo sido demonstrada por estudos fisiológicos, imuno-histoquímicos e bioquímicos, a neurotransmissão envolvendo os AAE (Carobrez, 1987; Wilklund et al., 1988; Beitz, 1989; Beart et al., 1990).

A glicina, um dos elementos necessários para ativar o canal do receptor NMDA, modula alostericamente o receptor, facilitando a abertura do canal iônico (Peterson, 1991). Enquanto tem um papel inibitório nos receptores da medula espinhal sensíveis a estricnina, tem-se mostrado também que modula a neurotransmissão excitatória por aumentar a despolarização das membranas dotadas de receptores NMDA em culturas de neurônios (Johnson e Acher, 1987). Em culturas de *Xenopus oocytes* (Klechner e Dingledine, 1988) e culturas de córtex visual (Huettnner, 1989), o requerimento da glicina na operação dos receptores NMDA é maior do que o aumento das concentrações de glutamato. O fato de drogas antagonistas do sítio de ligação da glicina produzirem efeitos ansiolíticos (Cobert e Dunn, 1991; Matheus et al., 1994) e a glicina ser um elemento modulatório essencial para ativar o canal iônico do receptor NMDA (Johnson e Acher, 1987), sugere que no

estado de ansiedade, os receptores NMDA encontram-se ativados. Em outras palavras, o efeito ansiogênico da glicina, se deve então, a ativação da neurotransmissão glutamatérgica na SCP dorsal.

A buspirona pertence a um grupo de drogas conhecidas como derivados azapirona. Os derivados azapirona possuem afinidade pelos receptores 5-HT_{1A} e funcionam, geralmente, como agonistas pré-sinápticos e agonistas parciais pós-sinápticos (Eison, 1990).

A buspirona foi investigada, inicialmente, como um agente antipsicótico potencial, devido a sua ação como antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D₂ (Nagatani e Kitamura, 1996). Entretanto, ela se mostrou eficaz como ansiolítico, em pacientes com distúrbio de ansiedade generalizada e, subsequentemente, descobriu-se a alta afinidade da buspirona pelos receptores 5-HT_{1A} (Taylor et al., 1982).

A partir desta descoberta, vários experimentos, em múltiplos tipos de modelos animais, foram realizados, na tentativa de explicar o mecanismo de ação de drogas que atuam sobre os sistemas serotoninérgicos, e na procura de novos agentes ansiolíticos clinicamente úteis. Entretanto, os resultados dessas pesquisas são bastante variados (Handley, 1995).

Os efeitos mais inconsistentes da buspirona, são observados no LCE. Neste teste a buspirona produz efeitos que variam da ansiólise (Dunn et al., 1989; Soderpalm et al., 1989), efeitos não específicos (Pellow e File, 1986; Critchley e Handley, 1987; Wada e Fukuda, 1991), até ansiogênese (Pellow et al., 1987; Klint, 1991).

Tem sido sugerido que esta variação de efeitos pode, em parte, ser explicada por variações no procedimento do teste e/ou variação nas doses empregadas (Soderpalm et al., 1989; Treit e Pesold, 1990).

Os efeitos da glicina microinjetada na SCP dorsal, associados a injeções periféricas de buspirona, foram analisados de acordo com os comportamentos observados no LCE.

A glicina microinjetada na SCP dorsal, antagonizou o efeito ansiolítico obtido pela buspirona, na dose de 0,25 mg/kg, para o parâmetro FEA. O antagonismo mencionado obviamente não é farmacológico e sim fisiológico, uma vez que a glicina não é um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, mas sim um agonista do receptor NMDA.

Alguns estudos mostram que a injeção de 5-HT na SCP dorsal aumenta o limiar de fuga, atenua o comportamento de conflito e diminui o medo provocado por sobressalto em ratos (Audi et al., 1989), sugerindo que os sistemas serotoninérgicos tem um papel direto no efeito aversivo provocado pela estimulação da SCP dorsal (Behbehani e Fields, 1979).

O mecanismo de ação da buspirona, em doses únicas, parece ser a inibição do disparo neuronal dos núcleos da rafe, e, conseqüentemente, redução da liberação de serotonina nas áres terminais (Dourish et al., 1986). O núcleo dorsal da rafe (NDR), um dos núcleos da rafe, possui projeções à SCP dorsal. Portanto, a diminuição do disparo do NDR acarreta na diminuição da liberação de serotonina na SCP dorsal. Visto que a aplicação de serotonina na SCP dorsal tem efeitos antiaversivos (Audi et al., 1988), a diminuição da concentração de serotonina na SCP dorsal, devido a inibição do disparo do NDR poderia explicar em parte, os efeitos ansiogênicos encontrados na interação glicina/buspirona em alguns parâmetros observados.

Existe uma série de manipulações, não genéticas e não farmacológicas, capazes de modular os níveis gerais de estresse do animal que, quando feitas antes de um teste em modelos animais de ansiedade, podem provocar mudanças profundas no comportamento do animal. A manipulação intencional ou acidental desses fatores, pode alterar dramaticamente o efeito de drogas (Hogg, 1996).

Quando colocados nos braços abertos, os animais, geralmente, mostram manifestações comportamentais (imobilidade ou congelamento) e fisiológicas (defecação e aumento de corticosteróides no plasma) (Pellow et al., 1985). O que se tem mostrado é que drogas ansiogênicas diminuem a

porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, dentro de uma faixa de doses que não afeta a atividade geral (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986; File, 1992). Nos resultados obtidos, em ratos confinados aos braços abertos, imediatamente antes do teste, a buspirona (5,0 mg/kg) provocou um decréscimo nos parâmetros, FEF, FT e FL. Já para os ratos confinados aos braços abertos 24 horas antes do teste, a mesma dose causou redução em todos os parâmetros de atividade geral medidos, quais sejam, FEF, FT, FAL e FL.

A buspirona, na dose de 2,5 mg/kg, provocou uma diminuição nos parâmetros FL e FEF em ratos confinados imediatamente antes do teste, e uma diminuição na FEF, na FT e na FL nos ratos confinados aos braços abertos 24 horas antes do teste no LCE.

Na dose de 0,25 mg/kg, a buspirona provocou um aumento na FAL em animais isolados previamente nos braços abertos imediatamente antes do teste no LCE. Houve diferença na FAL entre os animais controle de ambas as condições.

Os efeitos do tratamento podem variar de ansiolíticos a ansiogênicos (Rodgers e Cole, 1994). Essa variação poder ser devido a diferentes doses usadas (Soderpalm et al., 1989 e Treit, 1990).

Os dados obtidos corroboram os trabalhos citados acima, já que, como foi visto, as diferentes doses de buspirona,

tiveram diferentes efeitos nos parâmetro de atividade geral, com uma tendência a reduzir a atividade geral com o aumento da dose. Não foi observada diferença nos parâmetros TPA e FEA.

Falter et al. (1992), observaram que o isolamento prévio de animais, nos braços abertos do LCE, não alterava a linha de base, nos parâmetros medidos, nesses animais. Além disso observaram que o isolamento nos braços abertos não alterava o efeito ansiolítico do clordiazepóxido, um derivado benzodiazepínico. A buspirona não teve efeito nem ansiolítico nem ansiogênico em animais controle. Essa ausência de efeito não foi alterada para os parâmetros FEA e TPA, após o isolamento dos animais no braço aberto do LCE.

De modo geral, podemos observar que, a buspirona diminui os parâmetros de atividade geral, em ambas as condições (isolamento imediatamente e 24 horas antes do teste no LCE), de uma maneira dependente da dose.

O modelos animais de ansiedade envolvem, necessariamente, processos psicológicos, tais como, habilidade motora, motivação (privação de comida e/ou de água), percepção (estímulos dolorosos), aprendizagem e memória (Handley, 1995). Entretanto, a maioria desses modelos, não avalia fatores cognitivos.

O labirinto em T elevado, é um modelo animal de ansiedade e memória, proposto por Viana et al. (1994). Este

modelo, mostra a vantagem de avaliar também os fatores cognitivos, visto que, durante o experimento, após alguns testes, o animal aprende a evitar os braços abertos deste labirinto. A esquiva inibitória é a tarefa mais usada para estudar os mecanismos de memória (Bures, Buresova e Huston, 1983).

Os animais expostos previamente ao LTE, apresentaram aversão aos braços abertos. Este efeito parece ter sido provocado pela aquisição da esquiva inibitória, ou seja, o animal aprendeu a evitar os braços abertos, após a exposição prévia ao LTE. Nos experimentos realizados no LTE por Viana et al. (1994), a aversividade adquirida pelos braços abertos durante o primeiro dia do teste no LTE, era mantida 72 horas depois do teste.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que, essa aversão aos braços abertos, adquirida durante a exposição prévia ao LTE, pode ser observada 7 dias após, quando os animais são testados no LCE.

A aquisição da esquiva inibitória, neste modelo, mostrou ser um fator aversivo, visto que, a FEA e o TPA foram reduzidos nos animais controles (buspirona 0,0 mg/kg).

A buspirona, nas doses de 0,25 e 2,5 mg/kg, foi capaz de reverter o efeito ansiogênico gerado pela aquisição da esquiva inibitória.

Apesar de os efeitos ansiolíticos clínicos dos derivados azapirona aparecerem somente após vários dias, ou, semanas de tratamento (Schweitzer e Rickels, 1991), em modelos humanos experimentais, com voluntários saudáveis, tem-se observado efeitos ansiolíticos do tratamento agudo com derivados azapirona. Por exemplo, a buspirona diminui o tempo de extinção das respostas de condutância da pele provocada por estímulo sonoro aversivo condicionado (Deakin e Graeff, 1991), e, a ipsapirona atenuou os aumentos de ansiedade subjetiva, bem como, da pressão arterial induzidos por discursar em frente a uma video câmera (Zuardi et al., 1993).

A buspirona foi a primeira droga da classe das azapironas, que demonstrou atividade ansiolítica clinicamente relevante (Goldberg e Finnerty, 1979). Esta classe de drogas inclui também a gepirona, a ipsapirona, a tandospirona, o flesinoxan e o MDL 73005EF. Todos esses compostos agem como agonistas totais ou parciais dos receptores 5-HT_{1A} (Taylor e Moon, 1991).

Ao contrário do que ocorre na clínica, há um número considerável de inconsistências nos efeitos desses agentes, nos estudos com animais (Rodgers e Cole, 1994).

A buspirona tem sido testada em um grande número de modelos animais e, com raras exceções, tem provado ser ineficaz ou fracamente eficaz, na redução dos comportamentos

relacionados com a ansiedade (Howard e Pollard, 1990; Barret; 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os dados da literatura que mostram que os efeitos ansioseletivos da buspirona serem dependentes de variações no procedimento prévio ao teste do LCE.

Além disso, os diferentes efeitos apresentados pela buspirona, nas diferentes condições abordadas e nos diferentes parâmetros medidos, mostram que o efeito desta droga em regular os níveis animais de ansiedade, é dependente dos níveis basais de estresse do animal.

8 - Conclusões

Das respostas dos estudos comportamentais de ratos machos submetidos ao teste do LCE, submetidos previamente a manipulações procedurais ansioseletivas, obtivemos as seguintes conclusões:

1 - A microinjeção de glicina na SCP dorsal, é capaz de reverter o efeito ansiolítico obtido apartir da administração de buspirona na dose de 0,25 mg/kg.

2 - A buspirona, na dose de 5,0 mg/kg, mostrou um efeito sedativo, em todos os métodos utilizados, para quase todos os parâmetros de atividade geral.

3 - O procedimento de aquisição de esquiva inibitória, no LTE, reduziu a FEA e o TPA, sugerindo ser esse procedimento aversivo.

4 - O aumento da FEA e do TPA, provocado pelas doses de 0,25 e 2,5 mg/kg de buspirona, em ratos que adquiriram esquiva inibitória, sugere um efeito ansiolítico.

RESUMO

A buspirona, um derivado azapirona, tem efeitos ansiolíticos quando usada clinicamente. Porém, em modelos animais de ansiedade, em particular o labirinto em cruz elevado (LCE), seus efeitos são quase sempre inconsistentes, ou seja, oscilando entre efeitos ansiogênicos, efeitos ansiolíticos, dependendo da maneira como os testes são conduzidos e/ou das doses escolhidas para o teste. Alguns tipos de manipulações prévias, em modelos animais de ansiedade, podem alterar os níveis de estresse dos animais, afetando os parâmetros comportamentais observados. A substância cinzenta periaqueductal dorsal (SCPD) é uma estrutura do sistema nervoso central (SNC), que tem sido sugerida como uma região integrativa do neuroeixo, envolvida na manutenção de estados motivacionais de animais. A estimulação elétrica ou química da SCPD provoca uma reação altamente aversiva em roedores, e, em humanos. Uma segunda situação aversiva para roedores é a sua exposição prolongada ao braço aberto do LCE. Uma terceira situação aversiva consiste em submeter o animal a uma tarefa de aprendizagem de esquiva no labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal de ansiedade e memória, onde o animal aprende a esquivar-se dos braços abertos após sucessivas exposições.

Os efeitos de doses crescentes de buspirona, injetadas intraperitonealmente, foram analisados no LCE em ratos submetidos previamente a procedimentos diferentes: 1) estimulação química da SCPD pela microinjeção de glicina, um "co-agonista" do complexo receptor NMDA; 2) isolamento prévio dos animais nos braços abertos do LCE; 3) aquisição de esQUIVA inibitória no LTE. As medidas comportamentais obtidas no LCE compreenderam: frequência de entradas (FEA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPA); frequência de entradas nos braços fechados (FEF); frequência de levantar (FL); frequência de auto-limpezas (FAL); e frequência de tentativas de entradas nos braços abertos (FT). No experimento 1, em ratos microinjetados com glicina, observou-se a reversão do efeito ansiolítico demonstrado pela dose de 0,25 mg/kg de buspirona, nos parâmetros FEA ; no experimento 2, a buspirona na dose de 5,0 mg/kg, reduziu as medidas de atividade geral, FEF, FL, FAL e FT, porém não interferiu com os parâmetros FEA e TPA; no experimento 3, a aquisição da esQUIVA inibitória no LTE mostrou ser uma situação aversiva, reduzindo a FEA e o TPA. Contudo, esse efeito foi revertido pela buspirona nas doses de 0,25 e 2,5 mg/kg. Nossos resultados mostram que os efeitos da buspirona, em modelos animais de ansiedade, podem ser dependentes de manipulações prévias de procedimento. Sugerem ainda que diferentes

manipulações de procedimento resultam no envolvimento de diferentes sistemas neurotransmissores.

ABSTRACT

The buspirone, a azapirone derivative, has anxiolytic-like effects on clinical anxiety. However, when we use animal models of anxiety, particularly the elevated plus-maze (EPM), its effects are frequently inconsistent, variable, ranging from anxiolysis, through no specific effect to anxiogenesis, depending on the animal model utilized, the procedure of the tests, and/or the doses chosen for the test. Some manipulations performed before tests of animal models of anxiety can change the baseline level of stress, affecting the behavioral parameters, when comparing to control animals. The dorsal periaqueductal gray (DPAG) has been suggested to be an integrative region of the neuroaxis involved in maintenance of the level of motivation of the animals. The electrical or chemical stimulation of DPAG is highly aversive in rodents and in humans. A second aversive situation to rodents is the pre-isolation into open arm of the EPM. A third aversive situation is the acquisition of inhibitory avoidance on the elevated T-maze (ETM). The effects of crescent doses of buspirone, administered i.p., were analyzed on three different procedures: 1) chemical stimulation of DPAG, by microinjecting glycine, a receptor "co-agonist" in the NMDA complex receptor; 2) pre-isolation of the animals on the open arm of the EPM; and 3) acquisition of the inhibitory

avoidance on ETM. The behavioral parameters were, frequency of entries and time spent on the open arms, FEO and TSO; enclosed arms entries (EAE); rearings (REAR); groomings (GROO); tries (TRY). On the procedure 1, the glycine was able to revert the anxiolytic-like effect produced by the buspirone (0,25 mg/kg). On the procedure 2, the buspirone did not alter FEO or TSO but at 5,0 mg/kg was able to decrease the parameters of general activity EAE, REAR, GROO and TRY. On procedure 3, the pre-test on the ETM showed to be a situation highly aversive on the parameters FEO and TSO. This aversion induced after acquisition of the inhibitory avoidance, was reverted by the buspirone (2,5 and 5,0 mg/kg). Our results show, that the effects of the buspirone, on the animal models of anxiety, can be dependent on the previous manipulations of the animals.

9 - Referências Bibliográficas

AUDI, E.A.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Mediation by serotonin of antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central gray. J. Psychopharmacol., **2**: 26-32, 1984.

AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, C.E.; GRAEFF, F.G. Serotonergic mediation of the anxiolytic effect of intracerebrally injected propranolol measured in the elevated plus-maze, Braz. J. Med. Biol. Res., **22**: 699-701, 1989.

AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, R.M.W.; GRAEFF, F.G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. Psychopharmacology, **105**: 553-557, 1991.

BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region, Prog. Psychobiol. Physiol. Psychol., **13**: 67-222, 1988.

- BANDLER, R.J.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurons mediating defensive behavior in the rat by microinjection of excitatory amino acids, Behav. Brain Res., **15**: 107-119, 1985.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZANG, S.P. Integration of somatic in the autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: vicerotopic, somatotopic and functional organization, Prog. Brain Res., **87**: 269-305, 1991.
- BARNES, N.M.; CHENG, C.H.K.; COSTALL, B.; GE; J. KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J. Profiles of (R)/S(-)-zacopride and anxiolytic agents in a mouse model. Eur. J. Pharmac., **218**: 91-100, 1992.
- BARRET, J.E. Studies on the effects of 5-HT_{1A} in the pigeon Drug Rev. Res., **26**: 299-317, 1992.
- BARRET, J.E.; GLEESON, S. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: conflict and drug discrimination studies In RODGERS, R.J. & COOPER, S.J. (Eds) 5-HT_{1A} Agonists, 5-HT₃ Antagonists and Benzodiazepines: Their Comparative Behavioral Pharmacology. New York: John Wiley and Son, 1991, p. 59-105.

BEART, P.M.; SUMMERS, R.J.; STEPHENSON, J.A.; COOK, C.J.;
CHRISTIE, M.J. Excitatory amino acid projections to the
periaqueductal gray in the rat: a retrograde transport
study utilizing D[³H]aspartate and [³H]GABA. Neuroscience,
34: 163-176, 1990.

BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory
connection between periaqueductal gray and nucleus raphe
magnus mediates stimulation produced analgesia, Brain Res.,
170: 85-93, 1979.

BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; MULLETT, M.A. and ECKLUND, L.J.
Differential origin of brainstem serotonergic projections
to the midbrain periaqueductal gray and superior collicu-
lus of the rat. J. comp. Neurol. **250**: 498-509, 1986.

BEITZ, A.J. Possible origin of glutamatergic projections to
the midbrain periaqueductal gray and deep layer of the
superior colliculus of the rat. Brain Res. Bull. **23**: 25-35,
1989.

BEITZ, A.J.; WILLIAMS, F.G. Localization of putative amino
acid transmitters in the PAG and their relationship to the
PAG-Raphe magnus pathway, The Midbrain Periaqueductal Gray
Matter. New York: Plenum Press, 1991. p. 305-327.

BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; BOUWS, G.A.H.;
EISENGA, W.; SCHMIT, J. Behavioral physiology of
serotonergic and steroid-like anxiolytics as antistress
drugs. Neurosci. Behav. Rev., **14**: 529-534, 1990.

BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA Mediation of
the antiaversive action of minor tranquilizers. Pharmacol.
Biochem. Behav. **16**: 397-402, 1982.

BRANDÃO, M.L. Involvement of opioid mechanisms in the dorsal
periaqueductal gray in drug abuse. Neuroscience, **4**: 397-
405, 1993.

BRANDÃO, M.L.; MELO, L.L.; CARDOSO, S.H. Mechanisms of
defense in the inferior colliculus. Behav. Brain Res., **58**:
49-55, 1993.

BURES, J. & HUSTON, J.P. Physiological psychology research.
In A. BURES, J.; BUREŠOVÁ, O.; HUSTON, J.P. (Eds)
Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and
Behavior. New York, 1983. p. 1-6.

CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of the defense
reaction. In: BRANDÃO M.L. (Ed.) Neuroscience and Behavior.
Vitória : UFES, 1987. p. 21-29.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization, Behav. Brain Res., **58**: 27-47, 1993.

CELIS, M.E.; TORRE, E. Measurement of grooming behavior. Meth. neurosci., **14**: 378-388, 1993.

COPLAN, J.D.; GORMAN, J.M.; KLEIN, D.F. Serotonin related functions in panic-anxiety: a critical overview. Neuropsychopharmacology, **6**: 189-200, 1992.

CORBETT, R.; DUNN, R.W. Effects of HA-966 on conflict, social interaction and plus maze behaviors, Drug Dev. Res., **24**: 201-203, 1991.

CRAWLEY, J.N.; MOODY, T.W. Anxiolytics block excessive grooming behavior induced by ACTH₁₋₂, and bombesin. Brain Res. Bull., **10**: 399-401, 1983.

CRITCHLEY, M.A.F. & HANDLEY, S.L. Effects in the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors, Psychopharmacology, **93**: 502-506, 1987.

CUNHA, J.M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test, Pharmacology, **16**: 259-267, 1978.

DA-SILVA, S.L.; BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C. Behavioral effects of neurotensin applied to periventricular structures of rats. Braz. J. Med. Biol. Res., **22**: 711-715, 1989.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. Journal Psychopharmacology **5**: 305-315, 1991.

DOURISH, C.T.; HUSTON, P.H.; CURZON, G. Putative anxiolytics 8-OH-DPAT, buspirone and TVXQ7821 are agonists at 5-HT_{1A} autoreceptors in the raphe nuclei. Trends Pharmac. Sci., **7**: 212-214, 1986.

DUNN, A.J.; GUILD, A.L.; KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or B-endorphin. Pharmacol. Biochem. Behav., **15**: 605-608, 1981.

DUNN, R.W.; HURT, R.W. ACTH acts via an anterior ventral third ventricular site to elicit grooming behavior. Peptides, **7**: 651-657, 1986.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. Eur. J. Pharmacol., **169**: 1-10, 1989.

EDWARDS, J.G. Clinical anxiety and its treatment. Neuropep., **19**: 1-10, 1991.

EISON, A.S. Azapirones: history of development. J. Clin. Pharmac., **10**: 25-55, 1990.

ERIKSSON, E E HUMBLE, M. Serotonin in psychiatric pathophysiology. in: The Biological basis of Psychiatry Treatment., POHL, R. and GERSHON, S. (eds) Progress in Basic and Clinical Pharmacology, **3**: 66-119, 1990.

ERSPAMER, V. Pharmacologische studien über enteramin. i. mitteilung: über die wirkung acetoneextrakten der kaninchenmagenschleimhaut auf den blutdruck und auf isolierte überlebende organe, Arch. Exp. Path Pharmacol., **196**: 343-365, 1940.

ESPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature, **169**: 800-801, 1952.

ESSMAN, W.B. Serotonin in health and disease. Vol 1

Availability, Localization and Disposition, Spectrum

Public Inc, New York, 1978.

EVENDEN, J.L. Effects of 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)

tetralin (8-OH-DPAT) after repeated administration on a

conditioned avoidance response (CAR) in the rat,

Psychopharmacol., **109**: 134-144, 1992.

FALTER, U.; GOWER, A.J.; GOBERT, J. Resistance of baseline

activity in the elevated plus-maze to exogenous influences,

Behav. Pharmacol., **3**: 123-128, 1992.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a

coordinator of action in response to fear and anxiety. In

A. Depaulis and R. Bandler (Eds.) The Midbrain

Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and

Neurochemical Organization. New York: Plenum, 1991. p. 151-

173.

FILE, S.E. The search for novel anxiolytics. TINS, vol.10,

11: 461-463, 1987.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOT, J. M.; HEAL D.J.; MARSDEN C.A. (Eds). Experimental approaches to anxiety and depression. New York : Bendley, 1992. p.25-44.

FILE, S.E.; GONZALES, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. Pharmacol. Behav Biochem., **54**: 123-128, 1996.

GASANOV, G.G.; MELIKOV, E.M.; MOVSUMOV, G.D. Comparison of the effect of serotonin administered into the dorsal hippocampus on conditioned passive and active avoidance in rats. Biol. Med., **101(5)**: 517-519, 1986.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on parachlorophenylalanine (PCPA) attenuation of conflict behavior. Eur. J. Pharmacol., **9**: 319-324, 1970.

GERRITS, P.O.; CROON, D.H.; HOLSTEGE, G. A new subdivision of the at periaqueductal gray based on its myeloarchitecture. Neurosci. Lett., **16**: 232-236, 1993.

GEYER, M.A; PUERTO,A.; DAWSEY, W.J.; KNAPP, S.; BULLARD ,W.P.
and MANDELL, A.J. Histologic and enzymatic studies of the
mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. Brain
Res. , **106**: 241-266, 1976.

GISPEN, W. H.; ISAACSON R. L., ACTH-induced excessive
grooming in the rat. Pharmacol. Ther., **12**: 209-246, 1981.

GOLDBERG, H.L.; FINNERTY, R.J. The comparative efficacy of
buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. Am. J.
Psychiat., **136**: 1184-1187, 1979.

GOLDBERG, M.E.; MANIAN, A.A.; EFRON, D.H. A comparative
study of certain pharmacological responses following acute
and chronic administration of chlordiazepoxide. Life Sci.,
6: 481-491, 1967.

GRAEFF, F.G. The antiaversive action of drugs. In: THOMPSON,
T.; DEWS, P. B.; BARRETT, J. E. (Ed.) Advances in
Behavioral Pharmacology, Vol 6 - Neur. Pharm. Erlbaum :
Hillsdale, NJ 1987. p. 156.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems in anxiety. In: ROTH, M.;
BURROWAS, G.D.; NOYES, R. (Eds.) Handbook of Anxiety.
Amsterdam: Elsevier, 1990. v. 3, p. 307-354.

- GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (Eds.) New Concepts in Anxiety, London : Macmillan, 1991. p. 288-312.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo : Lemos, 1993a. p. 109-144.
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. Neuroscience, **4**: 181-211, 1993b.
- GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. J. Pharmacol. Exp. Ther., **173**: 277-283, 1970.
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHUTZ, M.T.B. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. Behav. Brain Res., **21**: 65-72, 1986.
- GRAEFF, F.G.; CAROBREZ A.P.; SILVEIRA, M.C.L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: CAVALHEIRO, E.A.; LEHMAN, J.; TURSKI L. (Eds) Frontiers in excitatory amino acids research. New York : Liss, 1988 p. 325-332.

- GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.;
OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray
in anxiety and panic. Behav. Brain Res., **58(1-2)**: 123-131,
1993.
- GRAY, J.A. The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry into
the Septo-Hippocampal System. Oxford University Press,
Oxford, 1982.
- GRAY, J.A. Neural systems, emotion and personality. In:
Neurobiology of Learning, Emotion and Affect. **pp**: 273-306.
Madden, J. (ed) Raven Press, New York, 1991.
- GREEN, S. Benzodiazepines, putative anxiolytics and animal
models of anxiety. Trends Neurosc., **143**: 101-104, 1991.
- GRIEBEL, G.; MISSLIN, R.; PAWLOWSKI, M.; VOGEL, E.
m-Chlorophenylpiperazine enhances noephobic and anxious
behavior in mice, NeuroReport, **2**: 627-629, 1991.
- GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE-AGUIAR, J.C.; GRAEFF,
F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the
NMDA receptors antagonist AP7 microinjected into the dorsal
periaqueductal gray, Psychopharmacology, **103**: 91-94, 1990.

- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour, Naunnyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol., **327**: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. 5-HT drugs in models of anxiety. Psychopharmacology , **112**: 13-20, 1993.
- HANDLEY, S. L. 5-hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment, Pharmac. Ther., **1**: 1 - 46, 1995.
- HOGG, S. A review of the vality and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety, Pharmac. Biochem. and Behav., **54**: 21-30, 1996.
- HOWARD, J.L.; POLLARD, G.T. Effects of buspirone in the Geller-Seifter conflict test with incremental shock. Drug Rev. Res., **19**: 37-49, 1990.
- HJORTH, S.; SODERPALM, B.; ENGEL, J.A. Biphasic effects of 1-5-HTP in the vogel conflict model. Psychopharmacology, **92**: 96-99, 1987.

HUETTNER, J.E. Indole-2-carboxylic acid: a competitive antagonist of potentiation by glycine at the NMDA receptor. Science, **243**:1611-1613, 1989.

JACOBS, B.L.; FORNAL, C.A. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. Pharmac. Rev., **43**: 563-585. 1991.

JENCK, F.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. Brain Res., **378**: 274-284, 1986.

JENCK, F.; BROEKKAMP, C.L.E.; DELFT, A.M.L.V. 5-HT_{1c} receptors in the serotonergic control of periaqueductal gray induced aversion in rats, Psychopharmacology, **100**: 372-376, 1990.

JOHNSON, J.W.; ACHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, Nature, **325**: 529-531, 1987.

JONES, B.J.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.M.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; OAKLEY, N.R.; TYERS, M.B. The potential anxiolytic activity of GR 38032F, a 5-HT₃ receptor antagonist. Br. J. Pharmacol., **93**: 985-993, 1988.

JURASKA, J.M., HENDERSON, C.; MÜLLER, J. Differential rearing experience, gender, and radial maze performance, Develop. Psychology., **17**: 209-215, 1984.

KENNET, G.A. 5-HT_{1c} receptor antagonists have anxiolytic-like actions in the rat social interaction model. Psychopharmacol., **107**: 379-384, 1992.

KENNET, G.A. 5-HT_{1c} receptors and their therapeutic relevance Curr. Opin. Invest. Drugs, **2**: 317-362, 1993.

KILFOIL, T.; MICHEL, A.; MONTGOMERY, D. & WHITING, R.L. Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. Neuropharmacology, **28**: 901-905.

KIM, J.J.; RISON, A.R.; FANSELOW, S.M. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. Behav. Neurosci., **107**: 1093-1098, 1993.

KLECKNER, N.W.; DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes, Science, **241**: 835-837, 1988.

KLINT, T. Effects of 8-OH-DPAT and buspirone in a passive avoidance test and in elevated plus-maze test in rats.

Behav. Pharmacol., **2**: 481-489, 1991.

KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat, Braz. J. Med. Biol. Res., **18**: 61-67, 1985.

LESH, K.P. The ipsapirone/5-HT_{1A} recptor challenge in anxiety disorders and depression. In: Serotonin 1A recptors in depression and Anxiety. STAHL, S.M.; GASTPAR, M. AND KEPPEL-HESELINK, J.M. (eds) Raven Press: 135-170, 1992.

LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse, Psychopharmacology, **92**: 180-185, 1987a.

LISTER, R.G. Interactions of Ro 15-4513 with diazepam, sodium pentobarbital and ethanol in a hole-board test. Pharmac. Biochem. Behav., **28**: 75-79, 1987b.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders, Pharmac. Ther., **46**: 312-340, 1990.

LOPES-DA-SILVA, N. Alteração no comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado em função da idade, do sexo e do isolamento social. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1994.

LOPES-DE-SOUZA, A.S.; CAROBREZ, A.P. Avaliação quantitativa e qualitativa da ansiedade no labirinto em cruz elevado através do índice de conflito. VII Reunião Anual da FESBE. Caxambu, 1992. Resumos. 1. 21.

LOVICK, T.A. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventral periaqueductal gray matter in the rat. In: The Periaqueductal Grey Matter, **pp**: 101-120. Depaulis, A. and Bandler, R. (eds) Plenum Press. New York, 1991.

LOVICK, T.A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems : role in adaptive behavioural responses. Prog. Neurobiol. **40**: 631-644, 1993a.

LOVICK, T.A. The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. Behav. Brain Res. **606**: 92-98, 1993b.

LU, CHANG-LIN.; SHAIKH, M.B.; SIEGEL, A. Role of NMDA receptors in hypothalamic facilitation of feline defensive rage elicited from the midbrain periaqueductal gray, Brain Res., 581: 123-132, 1992.

MATHEUS, M.G.; NOGUEIRA, R.L.; CAROBREZ, A.P.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. Psychopharmacology, **113**: 565-569, 1994.

McELROY, J.F.; DU PONT, A.F.; FELDMAN, R.S. The effects of fenfluramine and fluoxetine on the acquisition of a continued avoidance response in rats. Psychopharmacology, **77**: 356-359, 1982.

MELO, L. L. & BRANDÃO, M. L. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus, Pharmacol. Biochem. Behav., **51**: 317-321, 1994.

MELLOW, A.M.; LAWLOR, B.A.; SUNDERLAND, T; MUELLER, E.A.; MOLCHAN, S.E.; MURPHY, D.L. A pilot clinical trial of m-CPP in depression. In: Annual Meeting of the American Psychiatric Association, New Research Abstracts, Montreal, May, 1988.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. J. Comp. Physiol.

48: 254-260, 1958.

MURPHY, D.L.; LESCH, K.P.; AULAKH, C.S.; PIGGOTT, T.A.

Serotonin-selective arylpiperazines with neuroendocrine behavioral, temperature, and cardiovascular effects in humans. Pharmac. Rev., **43**: 527-551, 1991.

NASHOLD Jr., B. S.; WILLIAM, P. M. D.; SLAUGHTER, G. D.

Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J. Neurosurg., **30**: 14-24, 1969.

NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. 5-HT mediation of anti-aversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal grey, Behav. Pharmacol., **2**: 72-77, 1991.

NUTT, D.; LAWSON, L. Panic attacks, an overview of models and mechanisms. Br. J. Psychiat., **160**: 165-178, 1992.

ÖGREN, S. O.; BERGE, O. G.; JOHANSSON, C. Involvement of spinal serotonergic pathways in nociception but not in avoidance learning. Psychopharmacology, **87**: 260-265, 1985.

- OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach avoidance analysis of rat diencephalon. J. Comp. Neurol., **120**: 259-295, 1963.
- PARENT, A.; DESCARIES, L. and BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]-hydroxytryptamine. Neuroscience. **6**: 115-138, 1981.
- PELLOW, S.; JOHNSTON, A.; FILE, S.E. Selective agonists and antagonists for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes and interactions with yohimbine and FG7142 using the elevated plus-maze test in the rat, J. Pharm. Pharmac., **39**: 917-928, 1987.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat, Pharmacol. Biochem. Behav., **24**: 525-529, 1986.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, J. Neurosci. Met., **14**: 149-167, 1985.

PETERSON, L.S. Anticonvulsant drug potentiation by glycine in maximal electroshock seizures is mimicked by D-serine and antagonized by 7-chorokynurenic acid. Eur. J. Pharmacol., **199**: 341-348, 1991.

PRICHARD, S.M.; BEITZ, A.J. A Golgi analysis of the rodent periaqueductal gray, Neuroscience Abs., **6**: 429, 1980.

RAPPORT, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin). v. the presence of creatinine in the complex. a proposed structure of the vasoconstrictor principle, J. Biol. Chem., **180**: 961-969, 1949.

RASON, S.W.; MAGOUN, H.W. The hypothalamus. Ergeb. Physiol., **41**: 56, 1939.

REDGRAVE, P. and DEAN, P. Tectal inputs to PAG. In: The periaqueductal Grey Matter, **pp**: 199-211, Depaulis, A. and Bandler, R. (eds) Plenum Press, New York, 1991.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. Science, **164**: 444-445, 1969.

RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T.; BEHBEHANI, M.

Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. J. Comp. Neurol., **303**: 121-131, 1991.

ROBICHAUD, R. C.; SLEDGE, K. L. The effects of

p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat, Life Sci., **8**: 965-969, 1969.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus-maze by immediate prior exposure to social stressors, Physiol. Behav., **53**: 383-388, 1993.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol, Psychopharmacology **114**: 288-296, 1994.

ROELING, T.A.P.; VAN ERP, A.M.M.; MELLIS, W.; KRUK, M.R.;

VEENING, J.G. Behavioural effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat, Brain Res., **550**: 220-224, 1991.

- ROELING, T.A.P.; VEENING, J.G.; PETERS, J.P.W.; VERMELIS, M.E.J.; NIEUWENHUYS, R. Efferent connections of the hypothalamic "Grooming Area" in the rat, Neuroscience, vol **56**, **1**: 199-225, 1993.
- RYDIN, E.; SCHALLING, D.; ASBERG, M. Rorschach ratings in depressed and suicidal patients with low levels of 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid. Psychiat. Res., **7**: 229-243, 1982.
- SANGER, D.J. Effects of buspirone and related compounds on suppressed operant responding in rats, Pharmac. Exp. Ther., **254**: 420-426, 1990.
- SAUDOU, F.; HEN, R. 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular and functional diversity, Prexut Address, **184**: 327-379, 1994.
- SCHMITT, M.L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A.S.; GUIMARÃES, F.S. and CAROBREZ, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats, Neurosc. Lett., **189**: 93-96, 1995.

SCHUTZ, M.T.B.; DE AGUIAR J.C.; GRAFF, F.G. Antiaversive role of periaqueductal gray matter. Psychopharmacology, **85**: 340-345, 1985.

SCHWEITZER, E.; RICKELS, K. Serotonergic anxiolytics: a review of their clinical efficacy. In: 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: Their Comparative Behavioural Pharmacology, pp 366-376. Rodgers, J. and Cooper, S. J. (eds) Wiley, New York, 1991.

SHILLITO, E.E. A method for investigating the effect of drugs on the exploratory behavior of mice, Br. J. Pharmacol., **40**: 113-123, 1970.

SODERPALM, B.; HJORTH, S.; ENGEL, J.A. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and L-5-HTP in montgomery's conflict test. Pharmac. Biochem. Behav., **32**: 259-265, 1989.

SPRUIJT, B.M.; COOLS, A.R.; GISPEN, W.H. The periaqueductal gray: a prerequisite for ACTH induced excessive grooming, Behav. Brain Res., **20**: 19-25, 1986.

STEFANSKI, R.; PALEIKO, W.; KOSTOWISKI, W.P. & PLAZNIK, A.

The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. Neuropharmacology, **31**: 1251-1258, 1992.

STEIN, L.; WISE, C.D.; BERGER, B.D. Antianxiety action of benzodiazepines: decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system. In: Garattini, S.; Mussini, E.; Randall, L.O., eds, benzodiazepines. New York: Raven Express, 1973: 299-326.

STEINBUSH, H. M. W. and NIEUWENHUYS, R. The raphe nuclei of the rat brainstem : _ a cytoarchitectonic and immunohistochemical study. In: Chemical Neuroanatomy, **pp**: 131-209 ,Emson, P.C. (ed), Raven Press, New York, 1983.

TARGUM, S.D.; MARSHALL, L.E. Fenfluramine provocation of anxiety in patients with panic disorder. Psych. Res., **28**: 295-306, 1989.

TAYLOR, D.P.; MOON, S.L. Buspirone and related compounds as alternative anxiolytics. Neuropeptides **19**: 15-19, 1991.

- TAYLOR, D.P.; RIPLET, L.A.; STANTON, H.C.; EISON, A.S.;
EISON, M.S.; TEMPLE, J.R. Dopamine and antianxiety
activity. Pharmac. Biochem. Behav., **17**: 25-35, 1982.
- TREIT, D.; PESOLD, C. Septal lesions inhibit fear reactions
in two animal models of anxiolytic drug action. Phydiol.
Behav., **47**: 365-371, 1990.
- TWAROG, B.M.; PAGE, I.H. Serotonin content of some mammalian
tissues and urine and a method for its determination,
Am. J. Physiol., **175**: 157-161, 1953.
- VAN ERP, A.M.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; VEENING J.G.
Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced
electrically. Behavioural Brain Research, **59**: 95-101, 1993.
- VIANA, M.B.; TOMAZ, C. AND GRAEFF, F.G. The elevated plus-
maze: a new animal model of anxiety and memory. Pharmacol.
Biochem. Behav., **49**: 549-554, 1994.
- WADA, T.; FUKUDA, N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic,
diazepam and buspirone on exploratory activity of the rat
in an elevated plus- maze. Psychopharmacology, **104**: 444-
450, 1991.

WESTENBERG, H.G.; DAN BOER, J.A.; Serotonin functions in panic disorder; effect of 1-5-hydroxytryptophan in patient and controls. Psychopharmacology, **98**: 283-285, 1989.

WILKLUND, L.; BEHZADI, G.; KALEN, P.; HEADLEY, P.M.; NICOLOPOULOS, L.S.; PARSONS, C.G.; WEST, D.C. Autoradiographic and electrophysiological evidence for excitatory amino acid transmission in the periaqueductal gray projection to nucleus raphe magnus in the rat, Neurosci. Lett., **93**: 158-163, 1988.

YADIN, E.; THOMAS, E.; GRISHKAT, H.L. and STRICKLAND, C.E. The role of the lateral septum in anxiolysis. Physiol. Behav. **53**: 1007-1083, 1993.

YAMASHITA, K.; KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; OZAXI, T.; MIYAZAXI, A.; KAGOSHIMA, M.; UEKI, S. Neuroanatomical substrates regulating rat conflict behavior evidenced by brain lesioning. Neurosci. Lett., **104**: 195-200, 1989.

YOUNG, R.F. Brain and spinal stimulation: how and to whom? Clin. Neurosur. **35**: 429-447, 1989.

YOUNG, R.F.; JOHNSON, D.N. Comparison of routes of administration and the time course effects of zacopride and buspirone in mice using an automated light/dark test. Pharmac. Biochem. Behav., **40**: 733-737, 1991a.

YOUNG, R.F.; JOHNSON, D.N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. Pharmac. Biochem. Behav., **40**: 739-743, 1991b.